

**Elektrophysiologische Charakterisierung  
der durch Listeriolysin O von  
*Listeria monocytogenes* und chromosomaler  
Punktmutanten induzierten Membranporen in  
humanen embryonalen Nierenzellen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von  
**Renate Susanne Butler**  
aus Wolverhampton/GB

Giessen, 2004

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Harald Schmidt  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

1. Gutachter: Prof. Dr. Florian Dreyer

2. Gutachter: PD Dr. Eugen Domann

Tag der Disputation: 14. April 2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2	Listeriolysin O	4
1.3	Aufgabenstellung	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Zellkultur	9
2.1.1	Kultivierung der HEK293-Zelllinien	9
2.1.2	Aufbereiten der HEK293-Zellen für elektrophysiologische Messungen	10
2.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.2.1	Aufbereiten von <i>L. monocytogenes</i> für elektrophysiologische Messungen	11
2.2.2	Herstellung eines listerienfreien Überstandes	13
2.2.3	Bakterienzählung	13
2.3	Elektrophysiologische Messungen	15
2.3.1	Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes	15
2.3.2	Herstellung der Glas-Mikropipetten ("Patchpipetten")	17
2.3.3	Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik	18
2.3.4	Intra- und Extrazellulärlösungen	19
2.4	Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen	22
2.5	Verwendete pharmakologische Substanzen	23
2.6	Statistische Auswertung und Darstellung	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung der HEK293-Zellen	25
3.2	Wirkung von Listeriolysin O	27
3.2.1	Wirkung von Listeriolysin O auf Membranströme	27
3.2.2	Elementare Porenströme	32

3.3	Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit der Porenbildung durch eine Listeriensuspension	37
3.4	Porenbildung durch listerienfreien Überstand	39
3.5	Umkehrpotenzial des durch Listeriolysin O induzierten Porenstroms	40
3.6	Ca <sup>2+</sup> -Influx durch Listeriolysin O-Poren	43
3.7	Listeriolysin O induziert Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen in HEK293-Zellen	48
3.8	Bedeutung intrazellulär gespeicherten Ca <sup>2+</sup> bei der Aktivierung Ca <sup>2+</sup> -abhängiger K <sup>+</sup> -Kanäle in HEK293hSK4-Zellen	50
3.9	Einfluss von TEA auf das Umkehrpotenzial des Porenstroms	52
3.10	Einfluss des pH-Wertes auf die Porenbildung	54
3.11	Porenbildende Aktivität chromosomal codierter Listeriolysin O-Punktmutanten von <i>L. monocytogenes</i>	56
3.12	Einfluss einer Vorinkubation der HEK293-Zellen mit <i>L. monocytogenes hly W492A</i> auf die Porenbildung durch <i>L. monocytogenes</i> Wildtyp	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>85</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria (L.) monocytogenes* ist ein ubiquitäres, grampositives, asporogenes Stäbchenbakterium, das zur Gruppe der fakultativ intrazellulären Erreger gehört. Zur Gattung der Listerien gehören neben *L. monocytogenes*, welches sowohl human- als auch tierpathogene Eigenschaften aufweist, noch die tierpathogene Spezies *L. ivanovii* und die nichtpathogenen Formen *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*.

Die durch *L. monocytogenes* verursachten schweren lokalen und systemischen Infektionen werden als Listeriose bezeichnet und entstehen beim Menschen hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel wie Frischkäse, Rohmilch (Farber & Peterkin 1991) und rohem Fleisch (Vázquez-Boland et al. 2001). Hierbei spielt die Fähigkeit der Listerien, sich sogar bei Temperaturen um 4°C im Kühlschrank noch vermehren zu können, eine wichtige Rolle. *L. monocytogenes* zählt zu den typischen opportunistischen Erregern. Während eine Infektion bei immunkompetenten Menschen meistens blande verläuft, kann es besonders bei Patienten in reduziertem Allgemeinzustand wie immunsupprimierten, kranken und alten Menschen und Patienten mit konsumierenden Allgemeinerkrankungen, jedoch auch bei Kindern, Schwangeren und Neugeborenen zu lebensbedrohlichen Krankheitsverläufen kommen. Eine wesentliche Pathogenitätseigenschaft von *L. monocytogenes* ist das aktive Eindringen in Epithel- und Endothelzellen. Dadurch ist dieser Erreger in der Lage, wichtige Schutzbarrieren des Körpers wie die Darmepithelschranke, die Bluthirnschranke und die Plazentaschranke zu überwinden. In der Folge kommt es zu gefährlichen Infektionen wie vor allem Meningitiden, Meningoenzephalitiden, Rhombenzephalitiden, Septikämien, Bakteriämien, Endokarditiden und schweren Gastroenteritiden mit einer Gesamtmortalitätsrate von ca. 25% (Schuchat et al. 1991; Vázquez-Boland et al. 2001). So zählt *L. monocytogenes* bei Erwachsenen nach *Streptokokkus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und Streptokokken der Gruppe B zum vierthäufigsten Erreger der bakteriellen Meningitis und ist bei infizierten Neugeborenen sogar unter den drei häufigsten Erregern dieser

Erkrankung zu finden. Äußerst gefährlich ist außerdem die transplazentare Infektion des ungeborenen Kindes durch die symptomarme oder sogar symptomfreie Schwangere, die zur gefürchteten „Granulomatosis infantiseptica“ - einer Sepsis mit multiplen Abszessen und Granulomen in verschiedenen Organen des Feten - mit Frühgeburt oder Abort führen kann. Die Sterblichkeitsrate liegt hier bei über 80%.

*L. monocytogenes* besitzt die Fähigkeit, Wirtszellen zu infizieren, intrazellulär zu persistieren und sich von Zelle zu Zelle auszubreiten (Chakraborty & Goebel 1988). Diese Eigenschaften ermöglichen es dem Erreger, das humorale Abwehrsystem (zirkulierende Antikörper, Komplementsystem) des Körpers zu überwinden; daher bleibt nur noch die zelluläre Immunabwehr als Verteidigungsmechanismus. Die meisten der am intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* beteiligten Pathogenitätsfaktoren sind im sogenannten PrfA-abhängigen Virulenz-Gen-Cluster (vgc) codiert (Portnoy et al. 1992). Dieses Virulenz-Gen-Cluster umfasst sechs gut charakterisierte Gene (Leimeister-Wächter et al. 1990; Domann et al. 1991; Chakraborty et al. 1992; Domann 1992):

*prfA* = positive regulation factor A

(codiert für einen positiven Regulationsfaktor PrfA, welcher die Transkription der nachfolgend genannten fünf Gene in *L. monocytogenes* induziert)

*plcA* = phosphatidylinositol-specific phospholipase C type A

(Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C = PI-PLC)

*hly* = haemolysin (Listeriolysin O = LLO)

*mpl* = metalloprotease of *L*isteria (zinkabhängige Metalloprotease)

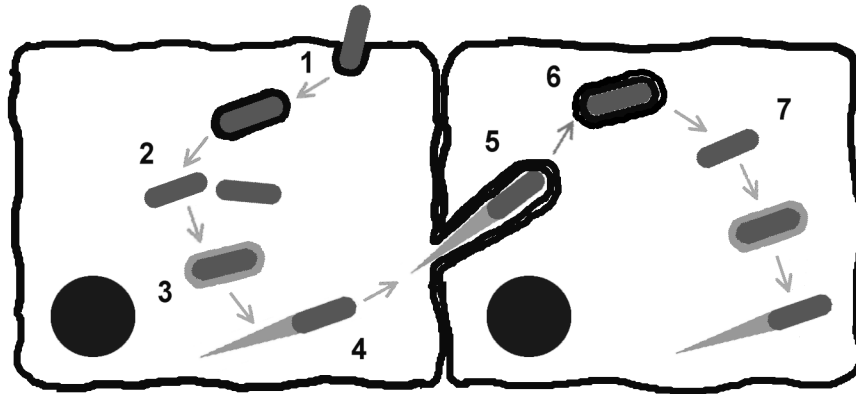
*actA* = actin nucleation factor A (Aktinfilament-akkumulierender Faktor A = ActA)

*plcB* = phosphatidylcholin-specific phospholipase C type B

(Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C oder Lecithinase = PC-PLC).

Außer diesen durch das Virulenz-Gen-Cluster codierten Pathogenitätsfaktoren wurden noch mehrere Internaline identifiziert, von denen jedoch nur Internalin A und Internalin B für die Invasion der Wirtszelle von Bedeutung sind (Kuhn et al. 1999).

Abbildung 1 stellt den Infektionszyklus von *L. monocytogenes* dar. Er beginnt mit der Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle durch Bindung der von ihm produzierten und in der Bakterienmembran verankerten Proteine Internalin A und B an Rezeptoren der Membran der Wirtszelle.



**Abb. 1:** Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (die involvierten Gene sind in Klammern aufgeführt): (1) Adhäsion und Internalisation (*inlA*, *inlB*), (2) Lyse der Vakuole (*hly*, *plcA*), Freisetzung und Vermehrung, (3) Akkumulation von Aktinfilamenten (*actA*), (4) Bildung von "Aktinpodesten" und Bewegung zur Zellmembran (*actA*), (5) Bildung pseudopodienähnlicher Ausstülpungen, (6) Internalisierung dieser Ausstülpungen durch die Nachbarzelle, (7) Lyse der doppelt vorliegenden Vakuolenmembran (*plcB*, *hly*) und Wiederholung des intrazellulären Lebenszyklus (modifiziert nach Chakraborty et al. 2000).

Der initiale Invasionsmechanismus der Listerien in die Wirtszelle ist bisher erst teilweise geklärt. Bei der Aufnahme in die Zielzelle spielen sowohl die oben genannten Pathogenitätsfaktoren als auch zelluläre Endozytoseprozesse eine Rolle. Nach Invasion in die Wirtszelle liegen die Listerien zunächst in einer Vakuole vor, deren Membran sie durch die Sekretion von Listeriolysin O (LLO) und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) zerstören (Abb. 1). Nach Freisetzung aus der Vakuole liegen die Bakterien dann frei im Zytosol ihrer Wirtszelle vor, wo sie sich vermehren und vom humoralen Abwehrsystem des Wirtsorganismus nicht angreifbar sind. In der infizierten Zelle akkumuliert das Bakterium mit Hilfe seines Oberflächenproteins ActA Aktinfilamente der Wirtszelle über seine gesamte Oberfläche, die sich schließlich an einem Pol der Listerien zu sogenannten "Aktinpodesten" bzw. "Aktinschwänzen" zusammenlagern, die wiederum die Listerien zur Zellmembran hin verschieben. Die Ausbreitung von Zelle zu Zelle erfolgt durch Ausbildung länglicher, pseudopodienähnlicher Ausstülpungen der Zellmembran, die Listerien enthalten, und anschließender Internalisierung dieser Ausstülpungen durch benachbarte Zellen. In der nächsten Wirtszelle erfolgt wiederum ein Freisetzen der Listerien durch LLO- und Phosphatidylcholin-

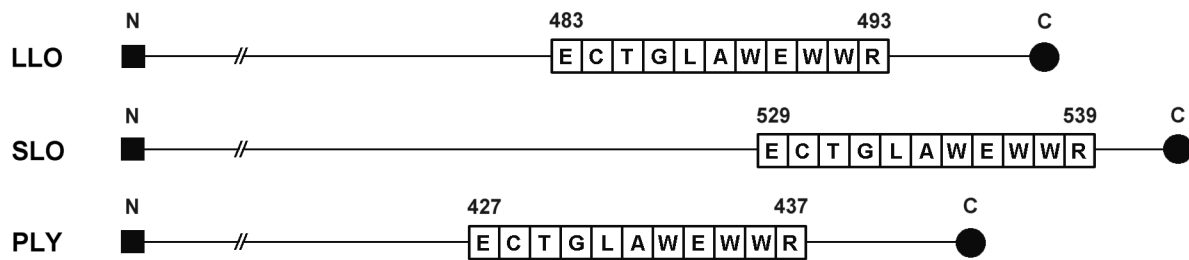
spezifische Phospholipase C (PC-PLC)-vermittelte Lyse der nun doppelt vorliegenden Vakuolenmembran und der beschriebene Zyklus von Vermehrung und Ausbreitung beginnt von Neuem (Portnoy et al. 1992; Tilney & Tilney 1993; Chakraborty & Wehland 1997; Cossart & Lecuit 1998).

## 1.2 Listeriolysin O

Ein bedeutender Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes* ist das sezernierte Protein Listeriolysin O (LLO) (Portnoy et al. 1988; Cossart et al. 1989). LLO ist ein porenbildendes Hämolyisin, welches zur Gruppe der thiolaktivierten, cholesterolbindenden Toxine gehört, die in hohen Konzentrationen Zielzellen lysieren und dadurch zytotoxisch wirken. Zu dieser Gruppe zählen bisher 23 Toxine grampositiver, pathogener Bakterien wie u.a. Streptolysin (SLO), Perfringolysin (PFO), Pneumolysin (PLY) und Alveolysin (ALY), die eine große Übereinstimmung (40 - 70%) in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Alouf 2000; Tweten et al. 2001).

Die essentielle funktionelle Bedeutung von LLO für die Pathogenität von *L. monocytogenes* zeigt sich durch Untersuchungsergebnisse mit mutierten Stämmen von *L. monocytogenes*, bei denen die Deletion des für LLO codierenden Gens *hly* zum Verlust der pathogenen Eigenschaften führte (Gaillard et al. 1986). LLO hat ein Molekulargewicht von 58,7 kDa und besteht aus 529 Aminosäuren (Goeffroy et al. 1987; Leimeister-Wächter & Chakraborty 1989). An Position 483 bis 493 enthält es ein sogenanntes "Undecapeptid" mit der Aminosäuresequenz ECTGLAWEWWR, welches für die cholesterolbindende und porenbildende, also lysierende Wirkung dieses Proteins verantwortlich ist. Dieses am C-terminalen Ende gelegene Undecapeptid ist hochkonserviert und ein gemeinsames Merkmal aller thiolaktivierten, cholesterolbindenden Toxine (Abb. 2).





**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Hämolyse Listeriolysin (LLO), Streptolysin (SLO) und Pneumolysin (PLY). Am C-terminalen Ende des LLO befindet sich an Position 483 bis 493 das Undecapeptid. Im SLO ist diese Aminosäuresequenz an Position 529 bis 539, im PLY an Position 427 bis 437 lokalisiert.

Im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* ist LLO sowohl für die Internalisation des Bakteriums durch die Wirtszelle als auch für die intrazelluläre Befreiung aus der Vakuole, die Proliferation im Zytoplasma und die Zell-zu-Zell-Infektion unentbehrlich (Portnoy et al. 1992; Tilney & Tilney 1993; Cossart & Lecuit 1998; Chakraborty 1999; Vázquez-Boland et al. 2001). Zudem kann LLO eine Vielzahl zellulärer Interaktionen und intrazellulärer Signalübertragungen beeinflussen. Dazu gehören die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (Tang et al. 1996), die Induktion der Produktion von Signalmolekülen wie Inositoltriphosphat und Diacylglycerol (Sibeliuss et al. 1996), die Modulation der Genexpression verschiedener Zytokine (Nishibori et al. 1996), die Expression von Adhäsionsmolekülen auf infizierten Endothelzellen (Krull et al. 1997), die Einschleusung heterologer Antigene für die MHC-Klasse-I-abhängige intrazelluläre Antigenprozessierung und Oberflächenpräsentation (Darji et al. 1995b), die Induktion der Zellapoptose (Guzman et al. 1996), die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B) (Kayal et al. 1999) und die Induktion der Schleimsekretion an Darmepithelzellen (Coconnier et al. 1998). All diese Effekte, die mit sublytischen LLO-Konzentrationen erzielt wurden, sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und können durch eine Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst werden (Berridge et al. 1998). Die Mechanismen, derer sich LLO bedient, um diese zellulären Wirkungen zu erzielen, sind jedoch noch unbekannt.

LLO ist von entscheidender Bedeutung für die Porenbildung in Zielzellen. Die Feststellung dieser Eigenschaft beruhte jedoch bis vor kurzem auf Untersuchungen zur hämolytischen Aktivität des LLO an Erythrozyten bzw. der Zytolyse ver-

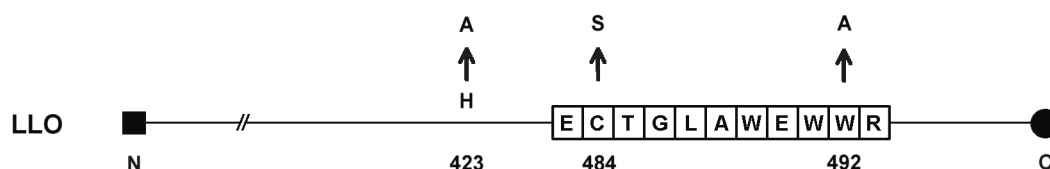
schiedener Zelltypen. Zur Erzielung dieser lytischen Effekte sind allerdings hohe LLO-Konzentrationen erforderlich, während die zellulären Wirkungen durch sublytische LLO-Konzentrationen hervorgerufen werden. Durch die Verwendung sehr hoher Konzentrationen von gereinigtem LLO ( $> 1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) war es möglich, oligomere Partikel mit einem Durchmesser von ca. 20 bis 30 nm in lysierten Erythrozytenmembranen elektronenmikroskopisch darzustellen, von denen man annahm, dass es sich um das morphologische Korrelat der LLO-Poren handelt (Jacobs et al. 1999). Bis vor kurzem gab es jedoch noch keine elektrophysiologischen Messungen und Charakterisierungen der durch LLO gebildeten Poren. Auch die klassischen Versuche mit künstlichen Lipidmembranen (lipid bilayers) führten zu keiner elektrophysiologisch messbaren Porenbildung. Daher war es ein großer Erfolg, als es unserer Arbeitsgruppe gelang, die durch LLO in sublytischen Konzentrationen gebildeten Poren in der Plasmamembran von nativen Zellen elektrophysiologisch darzustellen (Repp et al. 2002).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass drei verschiedene Porengrößen mit einer elementaren Leitfähigkeit von ca. 1150 pS, 2100 pS und 3000 pS existieren. Die Leitfähigkeiten der beiden größeren Porentypen entsprechen dabei ganzzahligen Vielfachen der Leitfähigkeit der "Grundpore". Weiterhin wurden Experimente mit dem mutierten Listerienstamm  $\Delta hly$  durchgeführt, welcher aufgrund der Deletion des Gens *hly* für LLO kein LLO produzieren kann (Guzman et al. 1995). Diese Messungen zeigten, dass die Deletionsmutante  $\Delta hly$  nicht in der Lage ist, Poren in der Plasmamembran der Zielzelle zu bilden. Somit konnte das von *L. monocytogenes* sezernierte Toxin LLO eindeutig als der für die porenbildende Wirkung verantwortliche Pathogenitätsfaktor identifiziert werden. In weiteren Patch-Clamp-Experimenten an NIH3T3-Mäusefibroblasten konnte beobachtet werden, dass es durch LLO-induzierte Porenbildung zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger, spannungsunabhängiger  $\text{K}^{+}$ -Kanäle kommt. Diese  $\text{K}^{+}$ -Stromaktivierung führte zu einer starken, transienten Hyperpolarisation des Membranpotenzials in den NIH3T3-Zellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es durch die Applikation von LLO zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt.

### 1.3 Aufgabenstellung

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der durch *L. monocytogenes* bzw. LLO in der Plasmamembran der Zielzelle gebildeten Poren. Die Selektivität der Poren für mono- und divalente Kationen, das Umkehrpotenzial und die Größe der LLO-Poren waren dabei von besonderem Interesse. Außerdem sollten die unmittelbaren funktionellen Konsequenzen der Porenbildung durch das Toxin LLO näher untersucht werden. Da im Verlauf der Experimente nachgewiesen werden konnte, dass es zu einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch die transmembranalen LLO-Poren mit nachfolgendem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg kommt, wurde in weiteren Messungen der Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen und die Bedeutung des intrazellulär gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$  näher untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der porenbildenden Aktivität verschiedener LLO-Punktmutanten. Für diese Experimente wurden die drei Punktmutanten *L. monocytogenes hly* H423A, *L. monocytogenes hly* C484S und *L. monocytogenes hly* W492A verwendet (Abb. 3), die uns von PD Dr. Eugen Domann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Chakraborty, Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Giessen, zur Verfügung gestellt wurden.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des LLO-Moleküls mit Angabe der Positionen, an denen bei den verwendeten Punktmutanten ein Austausch in der Aminosäuresequenz stattfand. An Position 483 bis 493 befindet sich das Undecapeptid, ein gemeinsames Merkmal aller thiolaktivierten, cholesterolbindenden Toxine. Nähere Erläuterungen siehe Text.

In der Mutante *L. monocytogenes hly* C484S wurde an Position 484, die innerhalb des Undecapeptids liegt, die Aminosäure Cystein (C) durch Serin (S) ersetzt, bei *L. monocytogenes hly* W492A wurde ebenfalls innerhalb des Undecapeptids an Position 492 die Aminosäure Tryptophan (W) gegen Alanin (A) ausgetauscht. In

*L. monocytogenes* hly H423A wurde die an Position 423 des LLO, also außerhalb des Undecapeptids, gelegene Aminosäure Histidin (H) durch Alanin (A) ersetzt. Bei diesen chromosomal codierten LLO-Punktmutanten ist das Gen *hly*, welches für LLO codiert, mutiert. Da die Punktmutation auf chromosomaler Ebene stattfindet, verhalten sich diese Mutanten hinsichtlich Expression, posttranslationaler Prozessierung und Sekretion von LLO wie der wildtypische Stamm von *L. monocytogenes*. Bei den mit diesen Mutanten durchgeführten Messungen konnte im Verlauf dieser Arbeit erstmals elektrophysiologisch nachgewiesen werden, dass bestimmte Aminosäuren des LLO-Moleküls von entscheidender Bedeutung für die porenbildende Wirkung von *L. monocytogenes* sind und dass das Undecapeptid des LLO dabei eine essentielle Rolle spielt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Kultivierung der HEK293-Zelllinien**

Bei der in dieser Arbeit verwendeten HEK293-Zelllinie handelt es sich um humane, embryonale Nierenzellen (HEK = Human Embryonic Kidney). Von diesen Zellen wurden Subklone hergestellt, die mit dem Gen für den humanen K<sup>+</sup>-Kanal kleiner Leitfähigkeit Nr. 4 (hSK4, auch hLK1 oder „Gardos-Kanal“ genannt) sowie einem Gen für Genitacin-Resistenz stabil transfiziert waren. Die Transfektion wurde in unserer Arbeitsgruppe mittels der Lipofektin®-Transfektionsmethode (GIBCOBRL™, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Der dabei verwendete, für hSK4 codierende Vektor wurde von Dr. W. J. Joiner (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA) zur Verfügung gestellt.

HEK293-Zellen wurden in einer 1:1-Mischung aus Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) und Ham's F12 Medium kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum (FKS) und 1% einer 200 mM L-Glutamin-Lösung zugesetzt wurden. Das Zellkulturmedium für die transfizierten HEK293-Zellen enthielt zusätzlich 400 µg ml<sup>-1</sup> des Aminoglycosid-Antibiotikums Genitacin (G418, Sigma, Deisenhofen), um einen ständigen Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

HEK293-Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator (CO<sub>2</sub>-Inkubator 6220, Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C und 95% Luftfeuchte in einer 94% Luft / 6% CO<sub>2</sub>-Athmosphäre kultiviert. Das Wechseln des Zellkulturmediums (10 ml) erfolgte jeden zweiten Tag, bis der Boden der Petrischalen (Ø 94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) dicht mit Zellen bewachsen war. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS = phosphate buffered saline: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) gespült. Anschließend wurde der konfluente Zellrasen vorsichtig mit 5 ml trypsinhaltiger (0,05% w/v) PBS-Lösung behandelt, bis im Lichtmikroskop eine beginnende Ablösung der Zellen vom Petrischalenboden beobachtet werden konnte. Die Trypsin-PBS-Lösung wurde dann abgesaugt. Die nur noch schwach adhärenen Zellen wurden durch kräftiges

Abspülen mit frischem Zellkulturmedium (10 ml) und wiederholtem Aufziehen in einer 10 ml Glaspipette vereinzelt. Anschließend wurde diese Zellsuspension in der gewünschten Verdünnung in neue Petrischalen, in die frisches Zellkulturmedium vorgelegt war, pipettiert. Die übliche Verdünnung betrug hierbei ca. 1:5 bis 1:10, wozu z.B. 2 ml der entstandenen Zellsuspension in 8 ml vorgelegtes neues Zellkulturmedium einpipettiert und anschließend durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschale gut verteilt wurden.

### **2.1.2 Aufbereiten der HEK293-Zellen für elektrophysiologische Messungen**

Die HEK293-Zellen wurden 36 bis 48 Stunden vor der elektrophysiologischen Messung in 35 mm Petrischalen in geringer Dichte ausplattiert, so dass die Zellzahl zum Zeitpunkt der Messung ca.  $4 - 5 \times 10^5$  Zellen pro Schale betrug. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich noch kein geschlossener Zellrasen gebildet hatte, um die Zellen in ihrer proliferativen Phase messen zu können. Dadurch sollten Messungen an wachstumsgehemmten oder bereits apoptotischen Zellen weitgehend vermieden werden. Es wurden immer Zellen ausgewählt, die in Form, Größe und Aussehen eine typische HEK293-Zelle repräsentierten (siehe Abb. 10A), um möglichst standardisierte Bedingungen bei den Messungen zu gewährleisten.

Unmittelbar vor einer Messung wurde der Zellrasen dreimal mit Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) (Abschnitt 2.3.4) gespült. Dann wurden 2 ml  $E_1$ -Lösung hinzugegeben. Nach etwa 10 min Wartezeit, während derer sich die Zellen vom Lösungswechsel "erholen" konnten, wurden die elektrophysiologischen Experimente begonnen.

## **2.2     *Listeria monocytogenes***

### **2.2.1    Aufbereiten von *L. monocytogenes* für elektrophysiologische Messungen**

Listeriolysin O (LLO) ist verantwortlich für die porenbildende Wirkung von *L. monocytogenes*. Von dem gereinigten Toxin standen jedoch für die zahlreichen geplanten Experimente nur Chargen mit jeweils geringen Toxinmengen und verschiedener biologischer Aktivität zur Verfügung, die - bezogen auf eine definierte LLO-Konzentration - im Erythrozyten-Hämolyse-Test bis zu einem Faktor von ca. 3 variierte (Daten von PD Dr. Eugen Domann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Chakraborty, Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Giessen). So konnten durch die notwendige Verwendung verschiedener Chargen keine optimal standardisierten Messbedingungen geschaffen werden. Daher wurde zur Durchführung der Experimente zur LLO-Porenbildung jeweils eine Suspension mit nativen Listerien hergestellt, die in ihrer porenbildenden Wirkung der des gereinigten Toxins entspricht (Abschnitt 3.2.1), jederzeit in jeder gewünschten Menge und Konzentration hergestellt werden konnte und reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

Die verwendeten Listerienstämme erhielten wir vom Institut für Medizinische Mikrobiologie (s.o.). Wir untersuchten den Wildtyp-Stamm von *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a (Chakraborty et al. 2000) und die drei Punktmutanten *L. monocytogenes hly* H423A, *L. monocytogenes hly* C484S und *L. monocytogenes hly* W492A. Bei diesen chromosomalen Punktmutanten ist das Gen *hly*, welches für LLO codiert, mutiert. Da die Punktmutation auf chromosomaler Ebene stattfindet, verhalten sich diese Mutanten hinsichtlich Expression, posttranslationaler Prozessierung und Sekretion von LLO wie der wildtypische Stamm von *L. monocytogenes*. Die Bakterienstämme wurden in BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion) bei 37°C auf Agarplatten angezüchtet. Dieses auch für die Aufbereitung der Listerien verwendete BHI-Medium ist ein Vollmedium, welches aus Gehirn- und Herzextrakt von Rindern hergestellt wird; 37 g dieser "Bouillon" werden mit 1 l Wasser versetzt.

Die Listerien wurden unter einer sterilen Werkbank (Fa. Heraeus, Hanau) am Vortag der Messung als 16-h-Kultur angesetzt. Dazu wurde mit einer ausgeglühten Öse eine Einzelkolonie von der BHI-Agarplatte in ein 100-ml-Erlenmeyer-Kölbchen,

in welchem 10 ml BHI-Medium vorgelegt waren, gegeben und gut gemischt. Die Bakteriensuspension wurde dann für 16 h in einem Rotationsschüttler (Aerotron, Fa. Infors AG, CH-Bottmingen) bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur auf Eis gestellt, um ein weiteres Wachstum der Bakterien zu verlangsamen. Während der 16-stündigen Inkubationsphase erreichen die Bakterien nach einigen Stunden ihre stationäre Phase und befinden sich dann im Ruhezustand mit minimiertem Stoffwechsel. Nach Erreichen dieses Ruhezustandes bleibt die Dichte der Bakterien weitgehend gleich. Daher wurde aus der 16-h-Kultur am Folgetag für jede Messung eine frische 3-h-Kultur hergestellt und die Bakterien damit aus ihrer stationären Phase heraus erneut aktiviert, d.h. in ihre exponentielle Wachstumsphase mit maximaler Aktivität überführt. Zur Herstellung der 3-h-Kultur wurden am Messtag 200 µl der für 16 h inkubierten und danach auf Eis gelagerten Bakteriensuspension in ein mit 10 ml BHI-Medium vorgelegtes Erlenmeyer-Kölbchen pipettiert. Dieses wurde dann für 3 h bei 180 rpm und 37°C im Rotationsschüttler inkubiert.

Nach diesen 3 h wurde die Listeriensuspension aus dem Rotationsschüttler entnommen und unter sterilen Bedingungen wurde 1 ml der gut gemischten Listeriensuspension in ein 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Diese Suspension wurde dann für 3 min bei 6.000 rpm zentrifugiert (Biofuge 15, Fa. Heraeus, Hanau). Nach dieser ersten Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und zu dem nun verbleibenden Bakterienpellet 1 ml der jeweils für die Messungen verwendeten E<sub>1</sub>-Lösung gegeben. Nach mehrmaligem Resuspendieren erfolgte eine erneute Zentrifugation für 3 min bei 6.000 rpm. Nach dieser zweiten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgesaugt und das verbleibende Pellet mit 1 ml E<sub>1</sub>-Lösung gut resuspendiert. Nach Fertigstellung der Listeriensuspension wurde die für die jeweilige Messung erforderliche Menge innerhalb einer Zeitspanne von 10 bis 15 min auf die zu messenden Zellen appliziert. Die mutierten Listerienstämme wurden nach demselben Protokoll für die elektrophysiologischen Experimente aufgearbeitet. Somit konnten für die einzelnen Messungen weitgehend standardisierte Bedingungen geschaffen werden.

Parallel zur ersten Zentrifugation erfolgte eine photometrische Bestimmung der Bakteriendichte (Biochrom 4000 UV-Visible Spectrophotometer, Fa. Pharmacia LKB, Freiburg) bei 650 nm, um sicherzustellen, dass jeweils die gleiche Anzahl von Listerien verwendet wurde. Die Messungen wurden nur mit Bakteriensuspensionen



durchgeführt, die eine optische Dichte von  $0,8 \pm 0,1$  aufwiesen. Für Messungen, bei denen unterschiedliche Bakterienkonzentrationen appliziert werden sollten, wurde entweder die zu applizierende Menge verändert oder eine Listeriensuspension mit entsprechend veränderter Konzentration hergestellt.

### **2.2.2 Herstellung eines listerienfreien Überstandes**

Zur Herstellung eines bakterienfreien Überstandes wurde eine Listeriensuspension wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben hergestellt. Diese Suspension wurde - nach einer 15-minütigen Wartezeit, die der Zeitspanne entspricht, in der die Listeriensuspension normalerweise am Messstand appliziert wird - nochmals für 3 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Bakterienpellet wurde verworfen. Dieser Überstand wurde nochmals für 3 min bei 15.000 rpm zentrifugiert und der neu entstandene Überstand wieder abgenommen. Dieser Überstand wurde dann für die elektrophysiologischen Messungen verwendet.

### **2.2.3 Bakterienzählung**

Um die Anzahl der Listerien, die sich in den Bakteriensuspensionen (Abschnitt 2.2.1) befanden, abschätzen zu können, wurden von der Suspension zunächst Verdünnungen im Verhältnis  $1:10^2$ ,  $1:10^4$ ,  $1:10^5$  und  $1:10^6$  in BHI-Medium hergestellt. Folgende Verdünnungsschritte wurden durchgeführt: Für die Konzentration  $1:10^2$  wurden 10 µl der Listeriensuspension mit 990 µl BHI-Medium verdünnt. Für die Verdünnung  $1:10^4$  wurden aus der vorherigen Verdünnung wiederum 10 µl in 990 µl BHI-Medium einpipettiert und für die Verdünnung  $1:10^5$  100 µl der vorherigen Verdünnung mit 900 µl BHI-Medium vermischt. Ebenso wurde für die Konzentration  $1:10^6$  100 µl der Verdünnung  $1:10^5$  in 900 µl BHI-Medium gegeben. Die anschließende Animpfung der BHI-Agarplatten erfolgte mit den Verdünnungen  $1:10^4$ ,  $1:10^5$  und  $1:10^6$ . Dazu wurden 100 µl der jeweiligen Verdünnung auf die Mitte der Agarplatte pipettiert und mit einem ausgeglühten Metallstab ausgestrichen. Die Agarplatten wurden danach für 16 h bei 37°C im Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau) inkubiert, anschließend erfolgte die Zählung der Bakterienkolonien. Nach Animpfen

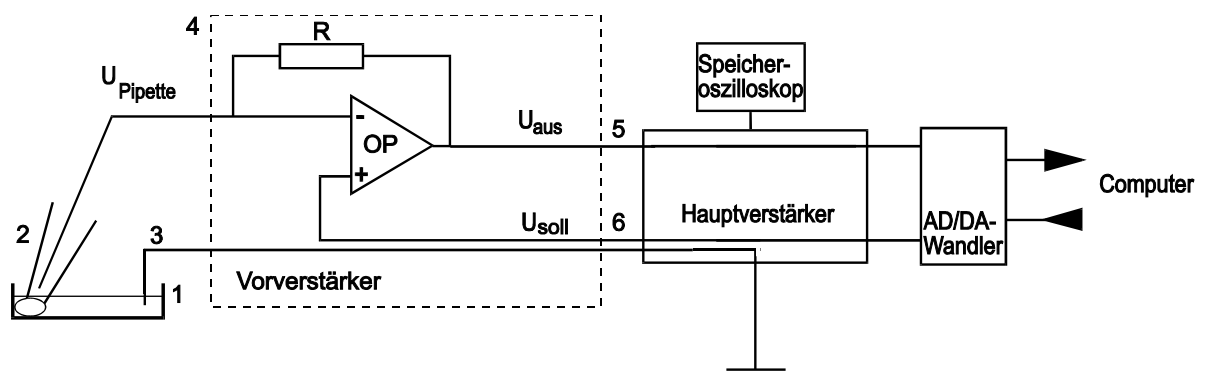
mit der Verdünnung  $1:10^5$  wurden ca. 800 Listerienkolonien auf einer Kulturplatte gezählt. Bei der Verdünnungsstufe  $1:10^6$  waren es ca. 110 Listerienkolonien. Dies ergibt eine Listerienzahl von ca.  $800 - 1100 \times 10^6$  pro ml Stammsuspension. Bei Applikation von 100  $\mu$ l Stammsuspension werden demnach ca.  $100 \times 10^6$  Listerien zu den zu messenden Zellen in 2 ml Badlösung gegeben, was damit einer Zahl von  $50 \times 10^6$  Listerien pro ml Badlösung entspricht. Bei einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^5$  HEK293-Zellen pro Petrischale errechnet sich somit eine Zahl von ca. 200 Listerien pro Zelle.

Im OD-Bereich von  $0,8 \pm 0,1$ , in dem die Listeriensuspensionen für elektrophysiologische Messungen eingesetzt wurden, ist die optische Dichte linear mit der Bakterienzahl korreliert.

## 2.3 Elektrophysiologische Messungen

### 2.3.1 Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes

Der schematische Aufbau der Messanordnung zur Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Patch-Clamp-Messstandes:

(1) Messkammer mit Badlösung, (2) Patch-Clamp-Pipette mit Ableitelektrode und Zelle, (3) Badelektrode, (4) Vorverstärker, (5) Ausgangsspannung, die in Abhängigkeit vom hochohmigen Rückkopplungswiderstand  $R$  in einen Strom umgerechnet wird, (6) vom Computer vorgegebene Kommandospannung, die in das einzustellende Potenzial umgerechnet wird.

Als Messkammer (1) wird eine Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm verwendet, in der die Zellen wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben vorbereitet wurden. Die Petrischale wird in eine Halterung im Objektisch eingesetzt und befindet sich somit im Strahlengang eines Invertmikroskops (Leica DM-IRB, Leica GmbH, Wetzlar). Über den Objektisch ist eine Kontrolle und Regelung der Temperatur der Badlösung während der Experimente möglich (Temperature Controller, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen). In die Messkammer hinein ragen die Badelektrode (3) und die Patch-Clamp-Pipette (2), die aus einer mit Intrazellulärlösung gefüllten Borosilikat-Glaskapillare ("Patchpipette") und einem chlorierten Feinsilberdraht (Fa. Heraeus, Hanau) als Ableitelektrode besteht. Die Glaskapillare ist in einem Pipettenhalter befestigt, der über einen Silikonschlauch und einen Dreiwegehahn mit einer 50 ml Kolbenspritze und einem Manometer verbunden ist. So kann ein kontrollierter Über- bzw. Unterdruck im Pipetteninneren erzeugt werden. Mit Hilfe

eines elektromechanisch getriebenen Mikromanipulators (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf) wird die Glaskapillare unter mikroskopischer Kontrolle an die Zellen am Boden der Messkammer herangeführt. Die Ableitung der Ionenströme erfolgt mit Hilfe eines externen Vorverstärkers (4) über die in den Elektrolytlösungen der Badkammer bzw. der Patchpipette befindlichen chlorierten Silberelektroden (Fa. Heraeus, Hanau). Dieser Vorverstärker weist einen Eingangswiderstand im Bereich mehrerer 100 G $\Omega$  auf und ist in der Lage, die sehr geringen Ströme unverfälscht aufzunehmen und in Spannungssignale mit niedrigem Ausgangswiderstand umzuwandeln. Diese Strom-Spannungskonvertierung ist nötig, damit die Signale ohne große Beeinträchtigung durch einstrahlende elektromagnetische Störungen zum räumlich getrennt stehenden Hauptgerät des Patch-Clamp-Verstärkers L/M-EPC-8 (List Electronics GmbH, Darmstadt) gelangen können. Nach der Endverstärkung und Aufbereitung durch den EPC-8 werden die Signale mit einem im EPC-8 integrierten 7pol-Bessel-Tiefpassfilter gefiltert, wobei als Cut-off-Frequenz jeweils ein Drittel der Frequenz der Aufnahmerate der Datenpunkte (sampling rate) gewählt wurde.

Die Darstellung der Signale erfolgt über den Analog/Digitalwandler des Interface-Gerätes ITC-16 (Instrutech Corp., Elmont, NY, USA) digitalisiert auf dem PC-Bildschirm. Das Patch-Clamp-Datenaufnahmeprogramm (Pulse + PulseFit, v 8.31, HEKA Elektronik, Lambrecht) ermöglicht mit Hilfe des Computers sowohl eine kontinuierliche Datenaufnahme bei einem vorgegebenen Haltepotenzial als auch die Aufnahme von Pulssequenzen mit verschiedenen Membranpotenzialen. Hierbei fungiert der Computer sowohl als Speichermedium für die eintreffenden Signale als auch als Steuergerät, in das sich komplexe Befehlssequenzen digital einprogrammieren und bei Bedarf abrufen lassen. Diese computergenerierten, digitalen Befehlssequenzen werden im Digital/Analogwandlerteil des ITC-16 in analoge Steuerspannungen umgesetzt, die mit Hilfe des EPC-8 und des Vorverstärkers in die gewünschten Spannungs- bzw. Strompulse umgewandelt und über die Elektroden an die Zellmembran angelegt werden. Der Vorverstärker dient dabei je nach Messmodus (Current/Voltage Clamp) als belastbare Strom- bzw. Spannungsquelle mit niedrigem Ausgangswiderstand. Die Datenanalyse und -aufbereitung erfolgt mit dem gleichen Rechner und den Programmen Pulse + PulseFit (v 8.31, HEKA Elektronik, Lambrecht), Patch (v 1.0, Bernd Letz), Igor Pro (v 3.15, WaveMetrics,

Oregon, USA), Excel 95 (v 7.0a, Microsoft) und GraphPad Prism (v 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

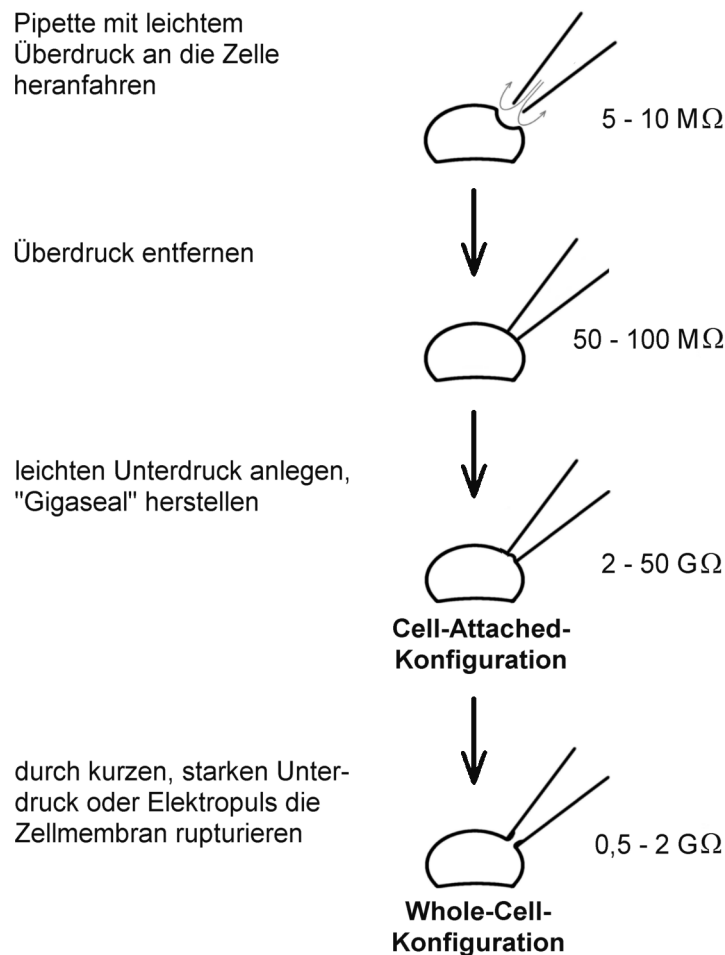
Das Invertmikroskop, die Messkammerhalterung und der Mikromanipulator sind innerhalb eines Faradayschen Käfigs pneumatisch gedämpft gelagert, um elektrische und mechanische Störeffekte zu minimieren.

### **2.3.2 Herstellung der Glas-Mikropipetten ("Patchpipetten")**

Die Mikropipetten ("Patchpipetten") werden in einem mehrstufigen Prozess mit einem Horizontal-Puller (Flaming-Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm) (Hilgenberg GmbH, Malsfeld) gezogen. Spitzenform und Öffnungsdurchmesser können dabei je nach Einstellung sehr variabel gewählt werden. Danach werden die Pipettenspitzen mit Hilfe einer Beschichtungs- und Feuerpolier-Apparatur (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) feuerpoliert. Durch das Feuerpolieren kann der Öffnungsdurchmesser der Pipette noch etwas verkleinert, mögliche Oberflächenunebenheiten des Glases eingeschmolzen und Verunreinigungen von der Pipettenspitze entfernt werden. Dies ermöglicht einen besseren Kontakt zwischen der Glaswand der Pipettenspitze und der Zellmembran.

### 2.3.3 Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik

Das Erstellen einer Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzell- bzw. Einzelzellableitungskonfiguration) der Patch-Clamp-Technik ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abb. 5:** Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (modifiziert nach Hamill et al. 1981). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Zunächst wird die mit Intrazellulärlösung (Abschnitt 2.3.4) gefüllte Patchpipette mittels des Mikromanipulators unmittelbar an die Membran der in der Badkammer befindlichen Zelle positioniert. Durch den vor Eintritt in die Badlösung mit Hilfe der Kolbenspritze und des Manometers angelegten Überdruck von ca. 100 cm Wassersäule auf die Pipettenlösung wird die Zellmembran in der letzten Phase der Annäherung der Pipette an die Zelle leicht eingedellt. Außerdem verhindert der

leichte Überdruck beim Eintauchen der Glaspipette in die Badlösung und während des Heranfahrens an die Zelle das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Pipette und ein Verschmutzen der Pipettenspitze durch in der Badlösung enthaltene Schmutzpartikel. Die Leitfähigkeit der Patchpipette wird dabei ständig durch einen Testpuls von 10 mV kontrolliert. Der elektrische Widerstand einer frei in die Badlösung ragenden Pipette liegt zwischen 5 und 10 MΩ. Durch Entfernen des Überdrucks nähern sich Pipette und Zellmembran soweit einander an, dass der Widerstand auf 50 bis 100 MΩ ansteigt. Nun wird durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks ein so enger Kontakt zwischen Zellmembran und Glaswand der Pipettenspitze geschaffen, dass der elektrische Widerstand auf 2 bis 50 GΩ ansteigt ("Giga-Seal", Hamill et al. 1981). Ausgehend von dieser Cell-Attached-Konfiguration kann man durch einen kurzen Unterdruckpuls oder Spannungsimpuls die Membran unter der Pipettenöffnung durchbrechen und gelangt so zur Ganzzell-Ableitungskonfiguration (Whole-Cell-Konfiguration). In dieser Messkonfiguration ist die Pipettenelektrode leitend mit dem Zytoplasma der Zelle verbunden und das Zytoplasma wird innerhalb kurzer Zeit durch die Intrazellulärlösung in der Pipette ausgetauscht.

In der Whole-Cell-Konfiguration lassen sich die Membranströme der gesamten Zelle messen. Außerdem kann in dieser Messkonfiguration die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung, wie z.B. die intrazelluläre Konzentration von  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , usw. kontrolliert verändert werden.

### **2.3.4 Intra- und Extrazellulärlösungen**

Die für die Patch-Clamp-Experimente verwendeten Ionenlösungen sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet. Bei den Experimenten wurden die als Extrazellulärlösung bezeichneten Lösungen an der physiologischen Zellmembranaußenseite und die als Intrazellulärlösung benannten Lösungen an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran eingesetzt. Die als physiologisch bezeichneten Lösungskombinationen sind durch eine hohe  $Na^+$ -Konzentration in der Extrazellulärlösung (Tabelle 1) und eine ebenso hohe  $K^+$ -Konzentration in der Intrazellulärlösung (Tabelle 2) gekennzeichnet.

**Tabelle 1:** Zusammensetzungen der Extrazellulärlösungen (Angaben in mM)

	NaCl	TEA-Cl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	Glucose	HEPES	PIPES
<b>E<sub>1</sub></b>	140	--	3	2	2	--	15	10	--
<b>E<sub>1</sub>Ba</b>	140	--	3	2	--	2	15	10	--
<b>E<sub>1</sub>TEA-Cl</b>	--	150	--	--	--	--	15	10	--
<b>E<sub>1</sub>pH6,5</b>	140	--	3	2	2	--	15	--	10

E<sub>1</sub> = Extrazellulärlösung mit physiologischer Lösungskombination

E<sub>1</sub>Ba = Extrazellulärlösung, bei der Ca<sup>2+</sup> durch Ba<sup>2+</sup> ersetzt war

E<sub>1</sub>TEA-Cl = Extrazellulärlösung mit Tetraethylammonium-Ionen und Cl<sup>-</sup>

E<sub>1</sub>pH6,5 = Extrazellulärlösung mit physiologischer Lösungskombination und pH-Wert 6,5

HEPES = 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure; PIPES = piperazine-N,N'-bis(2-ethane-sulfonic acid). HEPES und PIPES sind pH-Puffer, die im Bereich von 7,35 bis 7,75 (HEPES) und 6,10 bis 7,50 (PIPES) optimal puffern.

E<sub>1</sub> und E<sub>1</sub>Ba wurden mit ca. 4 mM NaOH auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt, E<sub>1</sub>TEA-Cl wurde mit 1,1 mM KOH auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt, E<sub>1</sub>pH6,5 wurde mit 4 mM NaOH eingestellt.

**Tabelle 2:** Zusammensetzungen der Intrazellulärlösungen (soweit nicht anders angegeben in mM)

	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>frei</sub>	Kalium-glutamat	NaCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	KCl	BAPTA	HEPES
<b>IBL<sub>0</sub></b>	--	140	20	2	--	--	0,1	10
<b>IBL<sub>100</sub></b>	100 nM	140	20	2	29,69 µM	--	0,1	10
<b>I<sub>KCl</sub></b>	--	--	--	--	--	150	--	10

IBL = Intrazellulärpuffer mit physiologischer Lösungskombination, mit BAPTA, low buffered

Indizes geben die nominelle freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Lösungen an. Bei den verwendeten Intrazellulärlösungen handelt es sich um in Bezug auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>frei</sub> schwach gepufferte Lösungen.

Alle Intrazellulärlösungen wurden mit ca. 0,3 mM KOH auf einen pH-Wert von 7,30 eingestellt.

BAPTA = 1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethan-N,N',N',N'-tetra-acetylsäure)



Für die in Bezug auf  $\text{Ca}^{2+}$  mit geringer Kapazität ("schwach") gepufferten Intrazellulärlösungen ("low-buffer"-Systeme) wurde zur Berechnung des einzuwiegenden  $\text{CaCl}_2$  die Formel

$$[\text{CaCl}_2]_{\text{Einwaage}} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} + \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} \times [\text{Chelator}]_{\text{Einwaage}}}{K_D + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}}$$

eingesetzt.

Hierbei bedeutet  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$  = gewünschte freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration,  $[\text{CaCl}_2]_{\text{Einwaage}}$  = einzuwiegende  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration und  $[\text{Chelator}]_{\text{Einwaage}}$  = eingewogene BAPTA-Konzentration. Der  $K_D$ -Wert für die Wechselwirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem Chelator BAPTA in den für  $\text{Ca}^{2+}$  schwach gepufferten Intrazellulärlösungen wurde für die entsprechenden Puffer nach der von Marks und Maxfield (1991) vorgeschlagenen Methode berechnet und beträgt 238 nM.

Die verwendeten Zellen reagieren auf Osmolalitätsunterschiede zwischen Intra- und Extrazellulärlösung häufig mit einer Anschwellung oder der Bildung von schwellungsbedingten Membranaussackungen. Um Membranstromaktivierungen durch Zellschwellung möglichst auszuschließen ("Stretch-activated-channels", Ordway et al. 1995; Petrou et al. 1995), wurden alle eingesetzten Lösungen mit einem Osmometer (Osmomat 030, gonotec GmbH, Berlin) auf ihre Osmolalität hin überprüft. Gegebenenfalls wurden die Extrazellulärlösungen durch Zugabe von Sorbitollösung (2M) auf Isoosmolalität (304 bis 342 milliosmol/kg) eingestellt.

Bei Verwendung unterschiedlicher Ionen in den Intra- und Extrazellulärlösungen bildet sich durch deren unterschiedliche Beweglichkeiten an der Spitze der Patchpipette im Sinne eines Donnan-Potenzials ein sog. Liquid-Junction-Potenzial aus (Barry & Lynch 1991; Neher 1992). Wenn notwendig, wurden die Membranpotenziale um dieses Liquid-Junction-Potenzial (bei den verwendeten Lösungen -10 mV) korrigiert.

## 2.4 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen

Für die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden zunächst HEK293-Zellen in 35 mm Petrischalen ausplattiert. Diese Petrischalen waren vorher speziell für die Fluoreszenz-Messungen präpariert worden, indem ein Loch von 15 mm Durchmesser in den Boden der Schalen gebohrt und dieses mit einem Glasplättchen bedeckt worden war. Dieses wurde dann durch Silikon (GE Silicones, Bergen op Zoom, Niederlande) fixiert. Am Messtag wurden die Zellen für 45 min bei 37°C mit dem fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Indo 1-AM (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) beladen. Bei Indo 1-AM handelt es sich um eine zellpermeable Zellfarbstoff-Esterverbindung, die nach Aufnahme ins Zellinnere durch zytosolische Esterasen gespalten wird, wobei ein nichtmembrangängiger Fluoreszenzfarbstoff-Anteil entsteht. Indo 1-AM wurde in Extrazellulärlösung mit einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  gelöst, zusätzlich enthielt diese Lösung zur besseren Dispersion von Indo 1-AM 16  $\mu\text{M}$  Pluronic F-127 (Molecular Probes, Eugene, USA). Nach der Inkubationszeit wurden die HEK293-Zellen zweimal mit Extrazellulärlösung gespült und erneut für 20 min bei 37°C inkubiert. Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem BioRad MRC1024 Confocal Imaging System aufgenommen und analysiert. Für Indo 1-AM liegt die optimale Anregungswellenlänge im Bereich von 351 bis 356 nm. Das Emissionsmaximum liegt für niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei einer Wellenlänge von ca. 475 nm, für hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei ca. 400 nm, d.h. nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  verschiebt sich das Emissionsmaximum von Indo 1-AM zu niedrigen Wellenlängen. Bei den im BioRad Confocal Imaging System benutzten Filtern lag die anregende Wellenlänge bei 352 nm, die Emissions-Wellenlänge für niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei 460 nm und für hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei 405 nm. Zur grafischen Darstellung der Originalregistrierungen wurde das Verhältnis dieser beiden Emissions-Wellenlängen, d.h. die Emission bei 405 nm dividiert durch die Emission bei 460 nm, gegen die Zeit aufgetragen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden als Graustufenbilder gespeichert und anschließend mit Scion Image Software (Scion Corporation, Frederick, USA) in Falschfarbenbilder konvertiert.

## **2.5 Verwendete pharmakologische Substanzen**

### **Cadmiumionen**

$\text{Cd}^{2+}$  blockiert vor allem nichtselektive Kationenkanäle und alle bekannten spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Randall 1998).  $\text{Cd}^{2+}$  wurde in einer Konzentration von 1mM verwendet.

### **Lysophosphatidsäure (LPA)**

Biologische Funktionen des Mitogens LPA sind u.a. die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, spannungsunabhängigen  $\text{K}^{+}$ -Kanälen in NIH3T3-Mäusefibroblasten (Repp et al. 1998) und HEK293hSK4-Zellen (Decker 1999), die Stimulation der Zellproliferation vieler verschiedener Zelltypen und die zelltypspezifische Stimulation oder Inhibierung der Zellmigration (Übersicht bei Moolenaar 1999). LPA wurde in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

### **Listeriolysin (LLO)**

LLO wurde als gereinigtes Hämolysin von *L. monocytogenes* in einer Konzentration von 50 ng  $\text{ml}^{-1}$  appliziert (Übersicht siehe Abschnitt 1.2).

### **SK&F 96365**

SK&F 96365 ist ein Blocker für rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Rink 1990), der in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  verwendet wurde.

### **Tetraethylammonium (TEA)**

TEA ist eine quaternäre Ammoniumverbindung und blockiert in mikro- bis millimolaren Konzentrationen verschiedene  $\text{K}^{+}$ -Kanaltypen. Seine blockierende Wirkung auf  $\text{K}^{+}$ -Ströme von Nervenfasern wurde erstmals von Hille (1967) beschrieben.

### **Thapsigargin**

Thapsigargin (Sigma, Deisenhofen) ist ein sehr spezifischer Blocker intrazellulär vorhandener  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, die in  $\text{Ca}^{2+}$ -speichernden Organellen wie z.B. dem Endoplasmatischen Retikulum zu finden sind. Durch die Hemmung dieses Enzyms wird die Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in diese intrazellulären Speicher verhindert, was

schließlich zu einer Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher führt (Darbha & Marchase 1996; Nofer et al. 1997) . Die in den Versuchen eingesetzte Konzentration betrug 10  $\mu\text{M}$ .

### **Verapamil**

Verapamil blockiert bevorzugt langsame, spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ (Übersicht bei Striessnig et al. 1998). Es wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

## **2.6 Statistische Auswertung und Darstellung**

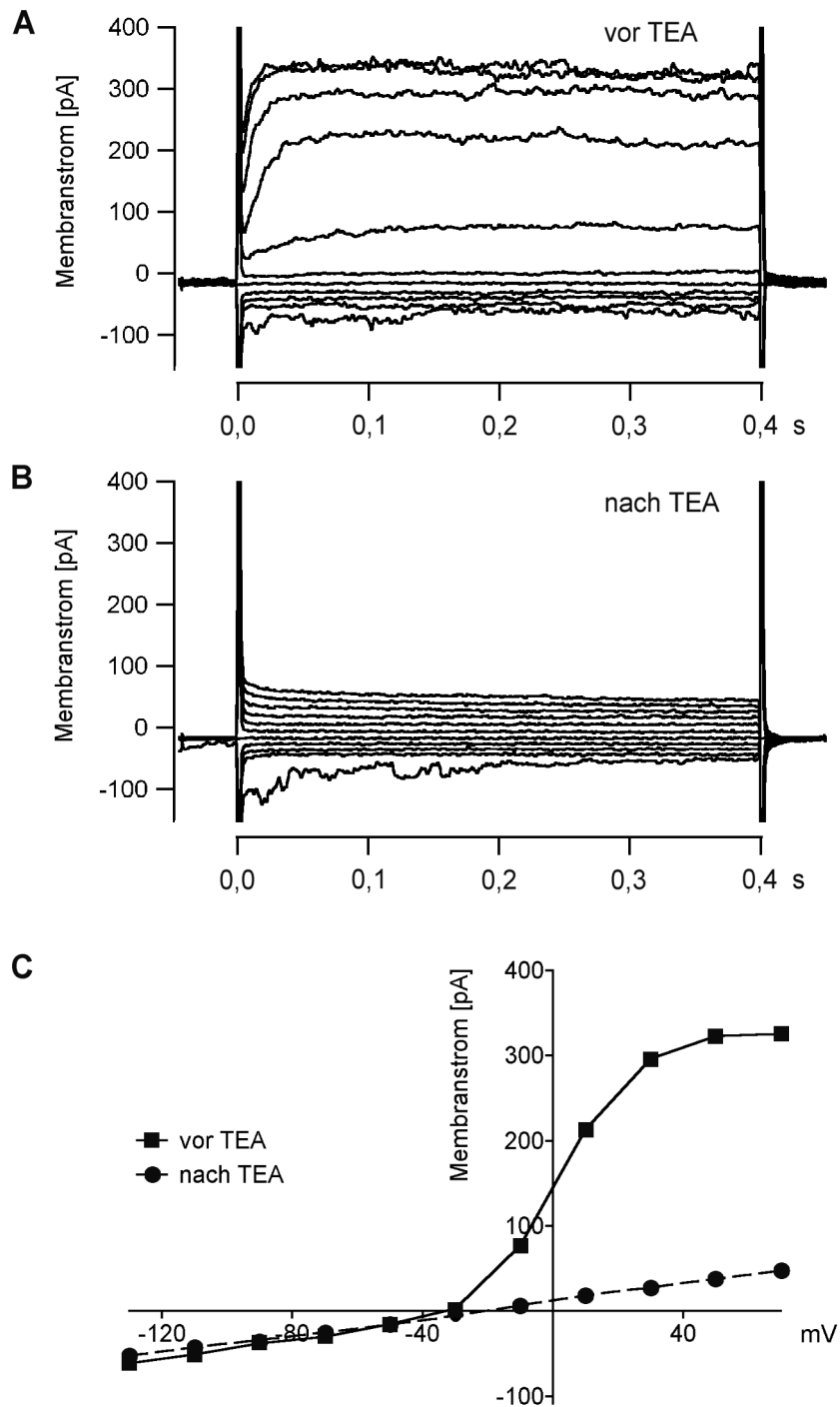
Die statistische Auswertung der Porenströme und die Erstellung der Amplitudenhistogramme wurden von Prof. Dr. Dierk Brockmeier, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der JLU Giessen, anhand der Gauss'schen Normalverteilung durchgeführt.

Die anderen in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen und die Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Sofern nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der HEK293-Zellen

Zu Beginn der Arbeit wurden zunächst die elektrophysiologischen Eigenschaften von HEK293-Zellen charakterisiert. HEK293-Zellen haben in der Whole-Cell-Konfiguration im Current-Clamp-Modus ein Ruhemembranpotenzial von  $-31,2 \pm 1,0$  mV ( $n = 88$ ). Typische Membranströme einer HEK293-Zelle bei verschiedenen Membranpotenzialen im Bereich von  $-130$  mV bis  $+70$  mV im Voltage-Clamp-Modus sind in Abbildung 6A dargestellt. Deutlich zeigt sich ab einem Membranpotenzial von  $-30$  mV die Aktivierung eines spannungsabhängigen, verzögert aktivierenden  $K^+$ -Stroms. Dieser spannungsabhängige  $K^+$ -Strom ist auch vorhanden, wenn nominell  $Ca^{2+}$ -freie Intrazellulärlösung benutzt wird, so dass es sich um einen  $Ca^{2+}$ -unabhängigen  $K^+$ -Auswärtsstrom handelt, einen sog. „delayed outward rectifier“. Dieser  $K^+$ -Strom wird durch den  $K^+$ -Kanalblocker Tetraethylammonium (TEA) (5 mM) vollständig blockiert (Abb. 6B). Die entsprechenden Strom-Spannungsbeziehungen der Membranströme vor und nach Applikation von TEA sind in Abbildung 6C dargestellt. Bei Membranpotenzialen negativer als  $-30$  mV wird nur ein geringer Membranstrom der Zelle registriert, der sich durch die Applikation von TEA nicht ändert. Dieser durch TEA nicht blockierbare Strom zeigt eine lineare Strom-Spannungscharakteristik bis zu einem Membranhaltepotenzial von  $+70$  mV und besitzt ein Umkehrpotenzial von  $-5,1 \pm 6,0$  mV ( $n = 5$ ). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich um einen unspezifischen Membranstrom (sog. „leakage current“) handelt. In HEK293-Zellen werden bei Membranpotenzialen negativer als  $-30$  mV keine endogenen, spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle aktiviert. In der Literatur wird für HEK293-Zellen außerdem ein transienter  $Ca^{2+}$ -Strom beschrieben, der bei positiven Membranpotenzialen ab  $-40$  mV durch Depolarisation aktiviert wird (Berjukow et al. 1996). Unter unseren Messbedingungen konnte dieser  $Ca^{2+}$ -Strom jedoch nicht registriert werden.



**Abb. 6:** Membranströme einer repräsentativen HEK293-Zelle in der Whole-Cell-Konfiguration vor **(A)** und nach **(B)** Applikation von TEA (5 mM). Das Membranpotenzial wurde in 20 mV-Schritten von -130 mV bis auf +70 mV verändert. Zwischen den einzelnen Spannungssprüngen wurde jeweils für 50 ms auf ein Haltepotenzial von -50 mV zurückgeschaltet. Die Amplituden der Membranströme wurden immer am Ende von 400 ms dauernden Spannungspulsen im Zeitintervall 280 - 380 ms gemessen und ergaben die zugehörigen Strom-Spannungskurven **(C)** vor (■) und nach (●) TEA-Applikation.

HEK293-Zellen zeigten sich somit für unsere Untersuchungen mit porenbildenden Toxinen als besonders geeignet, da bei negativen Haltepotenzialen ab -40 mV keine endogenen  $K^+$ - oder  $Ca^{2+}$ -Ströme zu beobachten sind und die Porenbildung damit ungestört von endogenen Ionenkanälen registriert werden kann. Aus diesem Grund führten wir die meisten Experimente bei diesem Haltepotenzial durch. Hier besitzt der unspezifische Membranstrom nur eine Amplitude von  $-11,5 \pm 2,0$  pA ( $n = 77$ ).

## **3.2 Wirkung von Listeriolysin O**

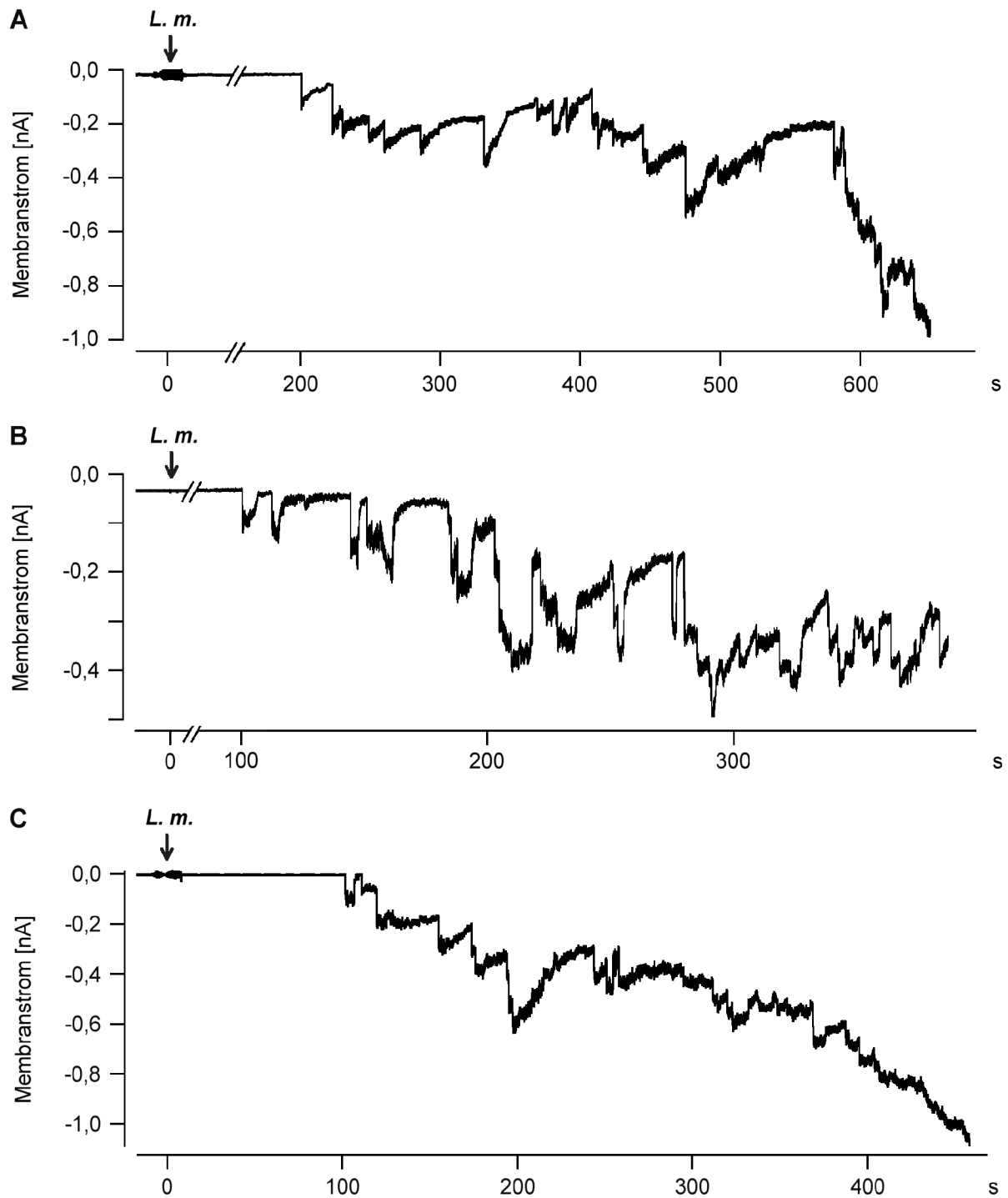
### **3.2.1 Wirkung von Listeriolysin O auf Membranströme**

Listeriolysin O (LLO) ist als der entscheidende Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes* verantwortlich für die porenbildende Wirkung dieses Bakteriums (Repp et al. 2002). Von dem gereinigten Toxin standen jedoch für die zahlreichen geplanten Experimente nur Chargen mit jeweils geringen Toxinmengen und verschiedener biologischer Aktivität zur Verfügung. Daher wurden die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur LLO-Porenbildung durch Verwendung einer Suspension mit nativen Listerien gewonnen (Details siehe Abschnitt 2.2.1).

Die Listeriensuspensionen zeigten die gleichen Effekte wie entsprechende Konzentrationen an gereinigtem LLO hinsichtlich des Öffnungs- und Schließungsverhaltens der LLO-Poren und des Zeitverlaufs der Porenbildung. Die Wirkung von 100  $\mu$ l Listeriensuspension ( $= 50 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung) entsprach der Wirkung von ca. 50 bis 150 ng  $ml^{-1}$  LLO aus verschiedenen Chargen, die in früheren Experimenten in unserer Arbeitsgruppe getestet worden waren. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Listeriensuspension (siehe Abschnitt 3.3) zeigte die gleiche steile Abhängigkeit wie die Konzentrations-Wirkungsbeziehung, die mit gereinigtem LLO gemessen wurde (Repp et al. 2002). Dass diese Effekte allein durch das von den Bakterien in die Suspension sezernierte LLO zustande kamen, zeigten Experimente, in denen nur der bakterienfreie Überstand dieser Suspension auf HEK293-Zellen appliziert wurde (Abschnitt 3.4). Wenn also im Weiteren von "LLO-Wirkung" gesprochen wird, beruht dies immer auf der Applikation einer Listeriensuspension.

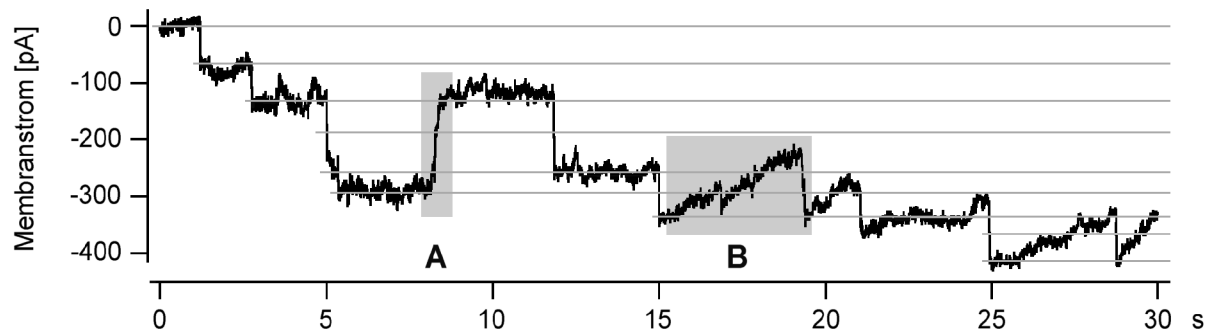
Abbildung 7 zeigt verschiedene, typische Originalregistrierungen der Membranströme von HEK293-Zellen nach Applikation einer Listeriensuspension. Abhängig von der Bakterienzahl und damit der LLO-Konzentration kommt es nach einer Zeitspanne von nur wenigen Sekunden bis einigen Minuten zur ersten Porenbildung in der Plasmamembran der HEK293-Zellen, was sich bei einem angelegten Membranpotenzial von -40 mV in einem plötzlichen Einwärtsstrom dokumentiert. Dieser Porenstrom nimmt dann wieder ab, bis es zu einem nahezu vollständigen Rückgang des Porenstroms auf den Ausgangswert kommt. Dies könnte sowohl einer Schließung als auch einer Inaktivierung der Pore durch Dissoziation von LLO-Molekülen aus der Membran in den Extrazellulärraum oder durch Endozytose der durch LLO gebildeten Pore entsprechen. Man sieht in Abbildung 7 sehr schön, dass es kurze Zeit nach Öffnung der ersten Pore zu einer weiteren bzw. erneuten Porenöffnung kommt und wieder zu einer - jetzt oft nur noch partiellen - Schließung bzw. Inaktivierung. Die Zahl der Porenöffnungen und -schließungen nimmt weiter zu, bis schließlich so viele Öffnungen und Schließungen in der Zellmembran registriert werden, dass die zugehörigen einzelnen Stromänderungen nicht mehr voneinander abgrenzbar sind. Die Membranstromamplitude kann dabei in Abhängigkeit der Anzahl gleichzeitig geöffneter Poren Werte zwischen -0,2 bis -2,0 nA bei einem Haltepotenzial von -40 mV annehmen. Sowohl der Zeitpunkt, an dem es zur Bildung der ersten Pore kommt als auch die Geschwindigkeit der weiteren Porenbildungen sind - ebenso wie die erreichten Membranströme - abhängig von der Konzentration der applizierten Listeriensuspension bzw. der darin enthaltenen LLO-Konzentration (Abschnitt 3.3).





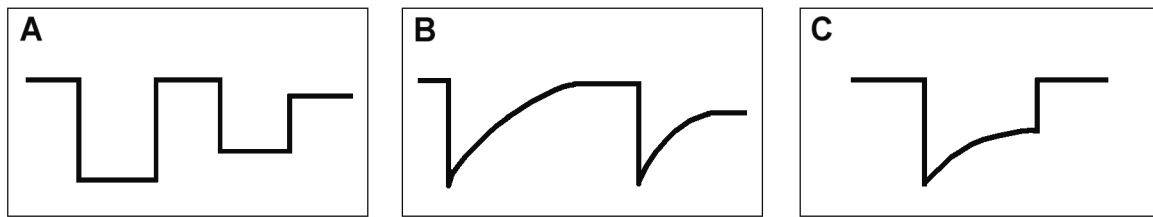
**Abb. 7:** Membranströme verschiedener HEK293-Zellen nach Applikation von **(A)** 25  $\mu$ l Listeriensuspension (=  $12,5 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung), **(B)** 50  $\mu$ l Listeriensuspension (=  $25 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung) und **(C)** 100  $\mu$ l Listeriensuspension (=  $50 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung). Das Haltepotenzial lag jeweils bei -40 mV. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Abszissen und Ordinaten in A, B und C!

Die Porenöffnungen und -schließungen zeigen unterschiedliche Charakteristika, was in einer höheren Zeit- und Amplitudenauflösung besonders gut zu sehen ist (Abb. 8).



**Abb. 8:** Porenbildung in der Plasmamembran einer HEK293-Zelle nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension ( $= 50 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung). Die Registrierung zeigt einen Ausschnitt von 30 s. Das Haltepotenzial beträgt -40 mV. Die Horizontalen stellen Stufen des Membranstroms dar, die dem Öffnen und Schließen der Poren entsprechen. **(A)** Sprunghafte Abnahme des Porenstroms. **(B)** Langsame Abnahme des Porenstroms.

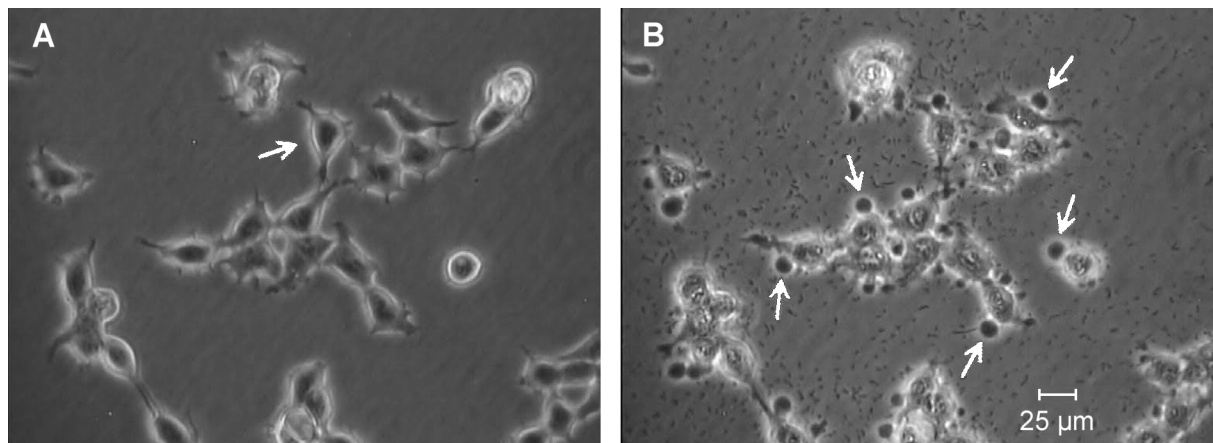
Während Porenöffnungen immer durch einen abrupten Anstieg des Membranstroms charakterisiert sind, können bei Porenschließungen zwei unterschiedliche Membranstromkinetiken beobachtet werden: in ca. 30% der Fälle kann der Porenstrom ebenso sprunghaft abnehmen, wie er sprunghaft zugenommen hat (Abb. 8A), in den anderen ca. 70% der Fälle kommt es zu einer langsamen Abnahme des Porenstroms, einer Art Relaxation (Abb. 8B). Beide Formen können sowohl zu einem vollständigen als auch nur partiellen Schluss der Pore führen. Die Abbildungen 9A und B zeigen schematische Darstellungen dieser möglichen Verschlussarten. Die in Abbildung 9C dargestellte Porenschließung stellt eine Kombination aus langsamer und sprunghafter Abnahme des Porenstroms dar, die ebenfalls beobachtet werden konnte.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Abnahmen des Porenstroms. Hauptsächlich konnten zwei verschiedene Kinetiken, die auf eine sprunghafte Porenöffnung folgen, charakterisiert werden: **(A)** eine ebenso sprunghafte Abnahme und **(B)** eine langsame Abnahme, die einen eher exponentiellen Verlauf nimmt. Beide Formen können zum vollständigen oder auch nur partiellen Schluss der Pore führen. **(C)** Kombination der beiden Verschlussarten: langsame, partielle Abnahme mit daran anschließender sprunghafter Abnahme des Porenstroms bis zum vollständigen Schluss.

Die langsame, eher exponentiell verlaufene Form des Porenschlusses könnte einer Endozytose der durch LLO gebildeten Pore entsprechen (Berridge et al. 1998; Conner & Schmid 2003). Um zu überprüfen, inwieweit der Prozess dieser möglichen Endozytose  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist, führten wir Messungen durch, bei denen extrazelluläres  $\text{CaCl}$  durch  $\text{BaCl}$  ersetzt wurde und somit eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Extrazellulärlösung geschaffen wurde. Auch unter diesen Versuchsbedingungen kam es zum Auftreten sowohl der schnellen als auch der langsamen Verschlussform ( $n = 4$  Zellen mit insgesamt 32 ausgewerteten Porenschlüssen). Es zeigte sich jedoch, dass die sprunghafte Abnahme des Porenstroms nun in ca. 60% der Fälle - gegenüber vorher 30% - auftrat und damit überwog und die langsame Porenstromabnahme nur noch in ca. 40% der Fälle - im Vergleich zu vorher etwa 70% - zu beobachten war.

Schon das Auftreten weniger geöffneter Poren führte dazu, dass das Membranpotenzial der HEK293-Zelle von -30 mV auf 0 zunahm. Zu dieser Verschiebung des Membranpotenzials kommt es durch Überwiegen des unspezifischen Porenstroms gegenüber dem spezifischen Strom durch endogene Ionenkanäle. Einige Minuten nach Beginn der Porenbildung waren mikroskopisch sogenannte „blebs“, Ausstülpungen der Membranoberfläche, zu erkennen (Abb. 10B). Inwieweit diese "blebs" auf eine mögliche Störung des Aktinzytoskeletts zurückzuführen sind, wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.



**Abb. 10:** Mikroskopische Aufnahme von HEK293-Zellen vor **(A)** und ca. 4 min nach **(B)** Zugabe von 100 µl Listeriensuspension. Die in **(A)** mit einem Pfeil markierte Zelle repräsentiert eine typische HEK293-Zelle, wie sie für die Messungen verwendet wurden. **(B)** Die Membranen der Zellen zeigen deutliche Ausstülpungen, sogenannte „blebs“ (siehe Pfeile).

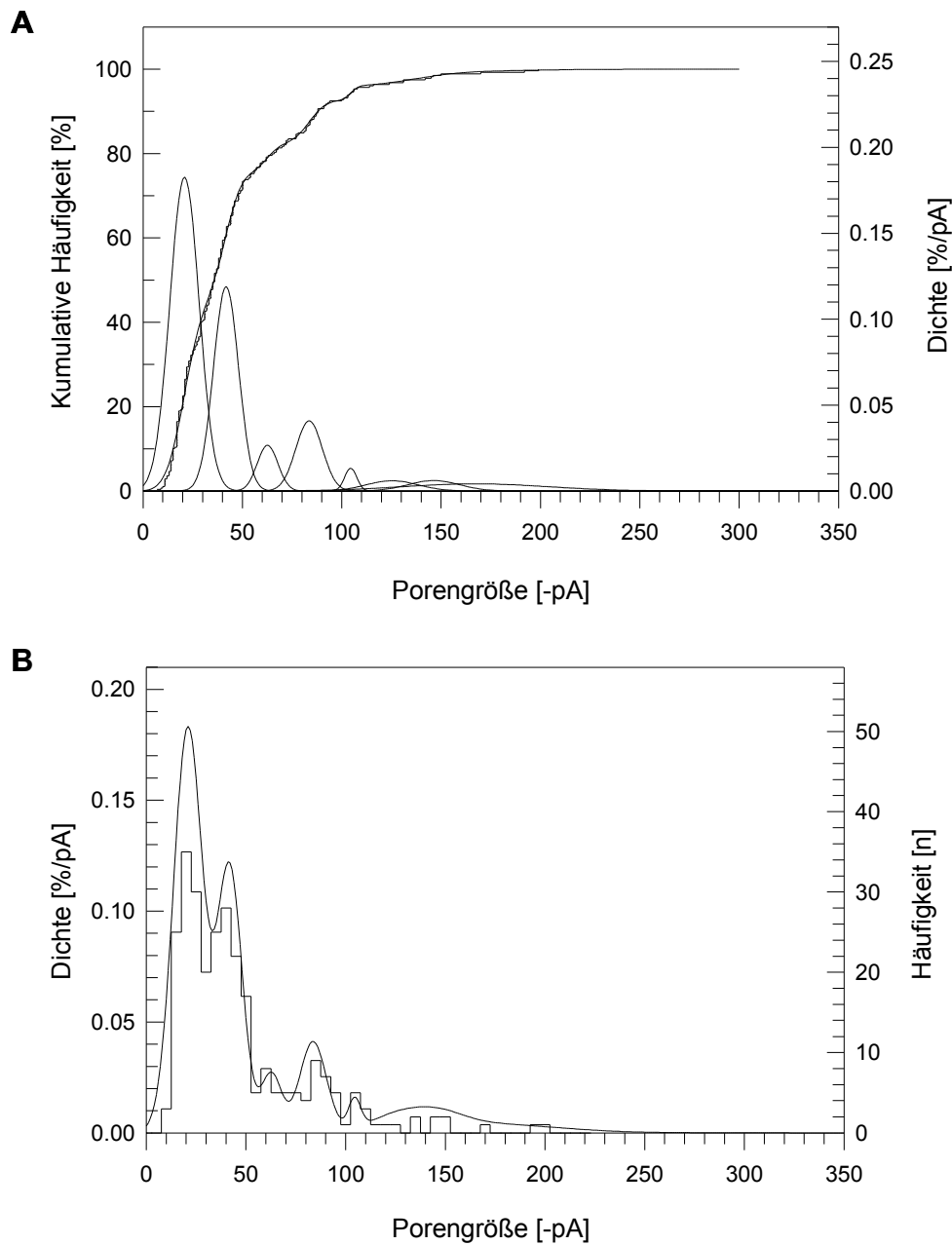
### 3.2.2 Elementare Porenströme

Zur Messung der Amplituden der Porenströme wurden nur Porenöffnungen herangezogen, da die Porenschließungen, wie in den Abbildungen 8 und 9 zu sehen ist, sowohl in einer schnellen als auch einer langsamen Form bzw. in einer Mischform registriert wurden, die nicht immer zu einer vollständigen Porenstromabnahme führten. Es wurden nur die Porenströme bis zu einem Gesamtmembranstrom von -1,0 nA ausgewertet. Die statistische Auswertung der Porenströme und die Erstellung der Amplitudenhistogramme wurden mit Hilfe von Gauss'schen Normalverteilungen durchgeführt. Hierfür wurden die Porengrößen nach der Größe ihrer Stromamplitude sortiert. Die kumulativen Häufigkeiten wurden gegen die Porengrößen aufgetragen und eine Summe Gauss'scher Normalverteilungen wurde an die Werte der kumulativen Häufigkeiten angepasst. Die Gauss'schen Normalverteilungskurven wurden mit Hilfe des Algorithmus von Abramowitz und Stegun (1970) erhalten. Die Anpassung der Funktionsparameter erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft Excel 97 SR-1). Es wurde das Auftreten einer kleiner Pore (= Grundpore) und derer ganzzahligen Vielfachen ermittelt. Im Anschluss an die erste Auswertung wurden separat für jedes Experiment Mittelwerte der Gauss'schen Normalverteilungskurve für die ganzzahligen Vielfachen der Grundpore berechnet.

Dabei ergaben sich individuelle Werte für die Grundpore bei den jeweiligen Konzentrationen. Aus diesen Werten wurde ein neuer Mittelwert gebildet. Mit diesem neuen Mittelwert wurde eine weitere Anpassung durchgeführt. Mit Hilfe des F-Tests wurde dann verglichen, ob sich die Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) für die Anpassungen mit der Annahme individueller Mittelwerte von der SAQ für die Anpassung mit der Annahme eines gemeinsamen Mittelwertes signifikant voneinander unterscheiden. Dies war nicht der Fall, so dass die Existenz einer einzelnen Grundporengröße - unabhängig von der benutzten Konzentration der Listerien-suspension - anzunehmen ist.

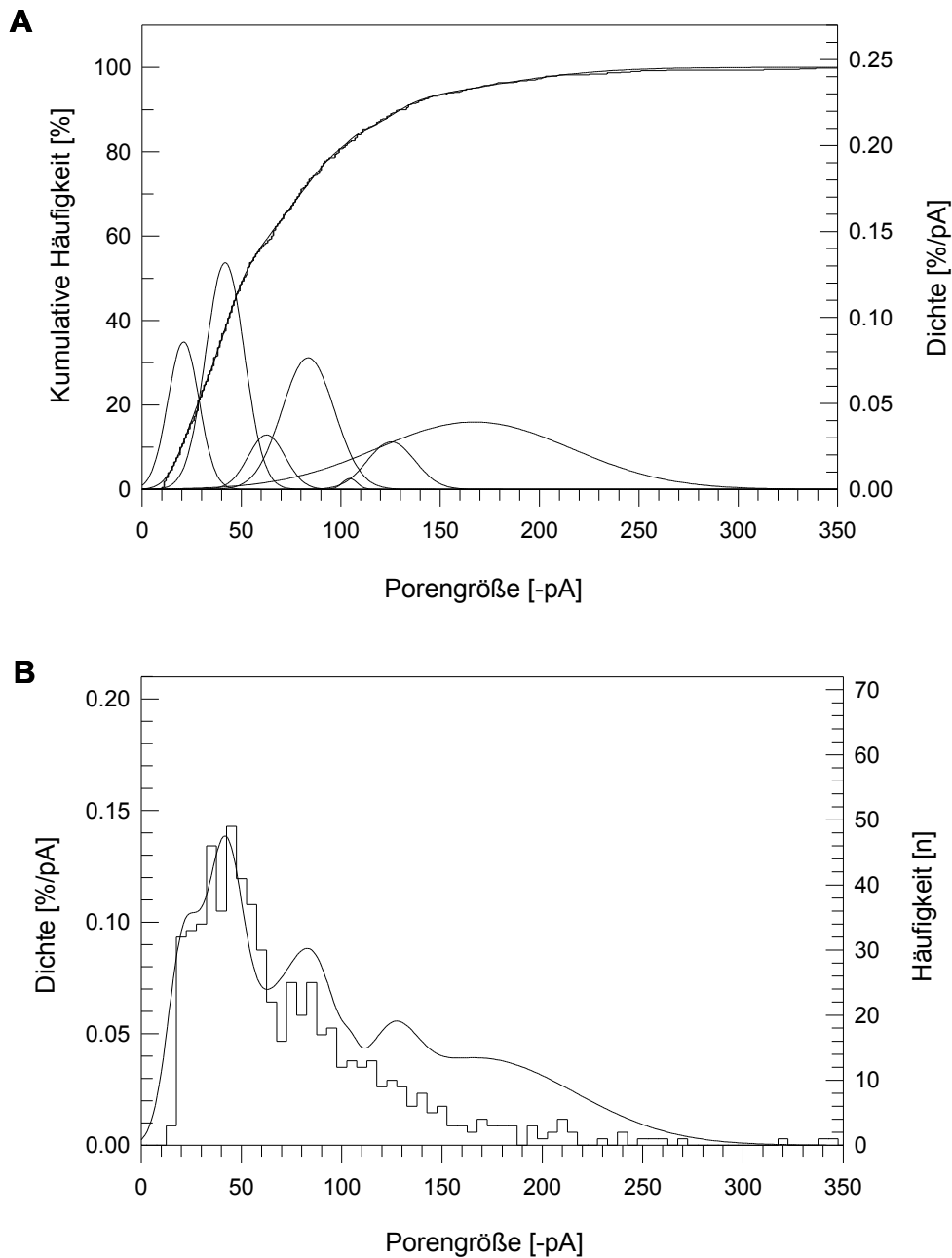
Abbildung 11A zeigt die Häufigkeitsverteilung der Porengrößen bei einem Applikationsvolumen von 25 µl Listeriensuspension ( $= 12,5 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung). Die Amplituden der elementaren Porenströme zeigten bei einem Haltepotenzial von -40 mV eine Häufung bei etwa -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -100 pA, -120 pA, -140 pA und -160 pA. Dies entspricht Leitfähigkeiten von ca. 500 pS, 1000 pS, 1500 pS, 2000 pS, 2500 pS, 3000 pS, 3500 pS und 4000 pS. Unter Berücksichtigung aller verwendeten LLO-Konzentrationen und aller gemessenen Porengrößen ergab sich für die kleinste Pore (= Grundpore) ein elementarer Porenstrom von  $-20,9 \pm 4,1$  pA bei einem Haltepotenzial von -40 mV, was einer elementaren Leitfähigkeit von  $523 \pm 102,5$  pS entspricht. Der elementare Porenstrom dieser Grundpore ist nur etwa halb so groß wie der elementare Porenstrom der kleinsten Pore, die bei früheren Messungen in unserer Arbeitsgruppe identifiziert wurde (-45,9 pA bei -40 mV Haltepotenzial; Repp et al. 2002).

Damit weisen die hier vorgestellten Ergebnisse erstmals die Existenz dieser Grundpore nach, die offensichtlich die kleinste der von LLO-Molekülen gebildeten „Poreneinheiten“ darstellt. In Abbildung 11B ist das Amplitudenhistogramm der gemessenen Porengrößen in Kombination mit der berechneten Häufigkeitsverteilung dargestellt.



**Abb. 11:** **(A)** Häufigkeitsverteilung aller gemessenen Porenströme nach Applikation von 25  $\mu\text{l}$  Listeriensuspension ( $= 12,5 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung) an HEK293-Zellen bei einem Haltepotenzial von -40 mV. Aus der kumulativen Häufigkeit wurden die dargestellten einzelnen Häufigkeitsgipfel mit Hilfe von Gauss'schen Normalverteilungen ermittelt (nähere Erläuterungen siehe Text). Es zeigt sich eine Häufung der Porenströme bei ca. -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA und -100 pA. Höhere Werte im Bereich von -120 pA, -140 pA und -160 pA zeigen bei dieser Konzentration nur eine geringe Häufigkeit. **(B)** Das Histogramm zeigt die jeweilige Anzahl der gemessenen Porenströme bei einer Bandbreite von 5 pA. Die durchgezogene Linie repräsentiert die umhüllende Kurve der einzelnen Häufigkeitsgipfel, die in (A) dargestellt sind.

Abbildung 12 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Porengrößen bei einer Applikationsmenge von 100  $\mu$ l Listeriensuspension.



**Abb. 12:** **(A)** Häufigkeitsverteilung aller gemessenen Porenströme nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension (=  $50 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung) an HEK293-Zellen bei einem Haltepotenzial von -40 mV. Aus der kumulativen Häufigkeit wurden die dargestellten einzelnen Häufigkeitsgipfel mit Hilfe von Gauss'schen Normalverteilungen ermittelt. Eine Häufung der Porenströme zeigt sich bei ca. -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -100 pA, -120 pA und -160 pA. **(B)** Das Histogramm zeigt die jeweilige Anzahl der gemessenen Porenströme bei einer Bandbreite von 5 pA. Die durchgezogene Linie repräsentiert die umhüllende Kurve der einzelnen Häufigkeitsgipfel, die in (A) dargestellt sind.

Tabelle 3 zeigt die prozentuale Häufigkeitsverteilung der gefundenen Porengrößen für vier verschiedene Konzentrationen. Hierbei entspricht  $I_0$  der Grundpore mit einem elementaren Porenstrom von  $-20,9 \pm 4,1$  pA bei einem Haltepotenzial von  $-40$  mV.

	$1 \times I_0$	$2 \times I_0$	$3 \times I_0$	$4 \times I_0$	$5 \times I_0$	$6 \times I_0$	$7 \times I_0$	$8 \times I_0$
<b>25 <math>\mu</math>l</b>	45,8	29,8	6,7	10,3	3,3	1,5	1,5	1,1
<b>50 <math>\mu</math>l</b>	20,9	17,4	32,3	9,5	7,4	5,5	2,0	5,1
<b>100 <math>\mu</math>l</b>	21,5	33,1	7,9	19,2	1,6	6,9	0,0	9,8
<b>150 <math>\mu</math>l</b>	25,9	45,4	4,5	17,2	1,3	0,4	1,9	3,5

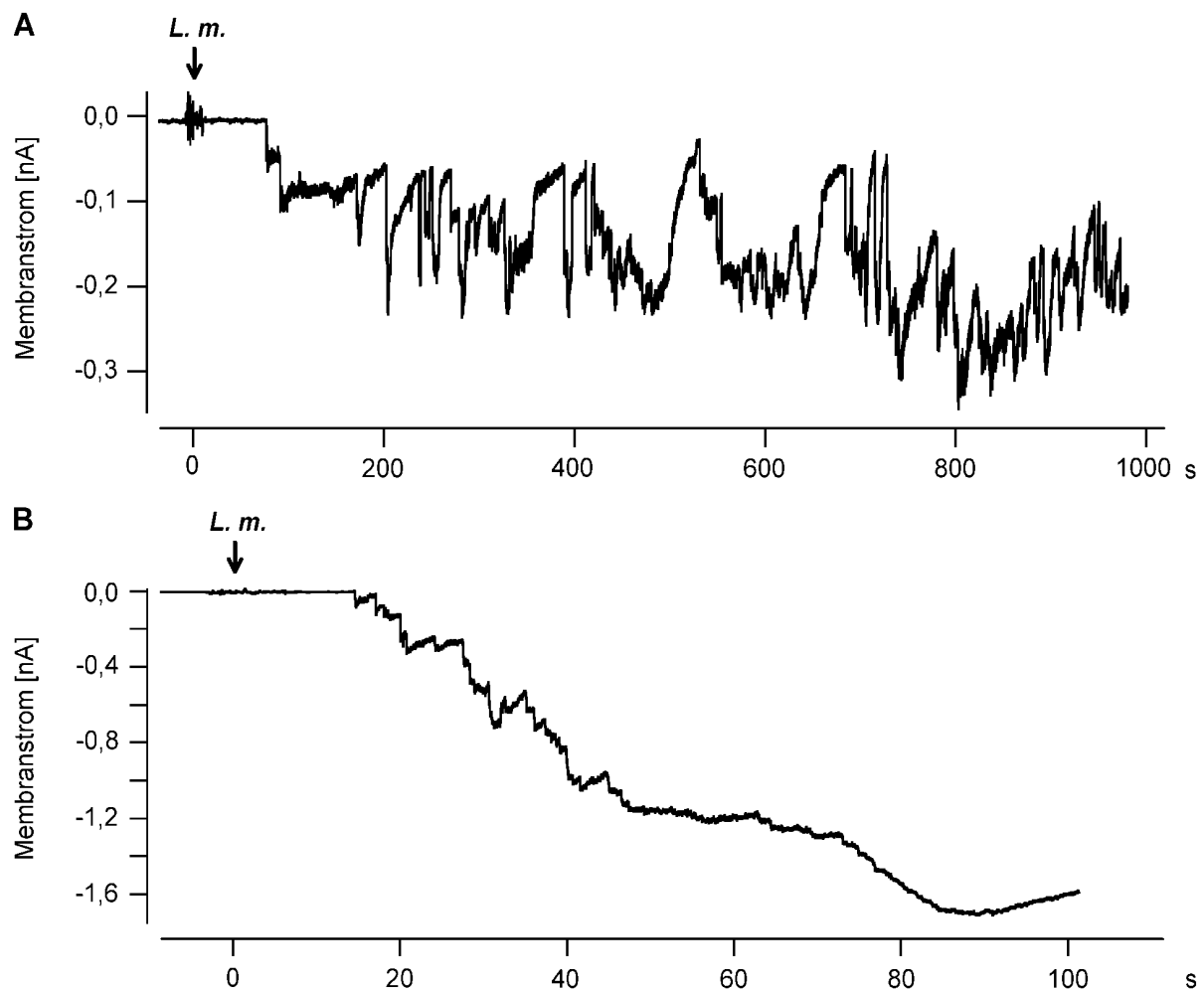
**Tab. 3:** Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Grundpore ( $= I_0 = -20,9 \pm 4,1$  pA bei einem Haltepotenzial von  $-40$  mV) und ihrer ganzzahligen Vielfachen nach Applikation von jeweils 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l und 150  $\mu$ l Listeriensuspension. Deutlich zeigt sich eine Häufung der Porenströme im Bereich von  $1 \times I_0$  bis  $4 \times I_0$ . Höhere Werte von  $5 \times I_0$  bis  $8 \times I_0$  zeigen eine geringere Häufigkeit, treten jedoch besonders bei höheren Konzentrationen vermehrt auf. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Daten in Tabelle 3 und der Vergleich von Abb. 11 und 12 zeigen deutlich, dass mit höheren Konzentrationen an LLO - entsprechend einem größeren Volumen an applizierter Listeriensuspension - das Auftreten von größeren Poren wahrscheinlicher wird. Die Grundpore nimmt in ihrer Häufigkeit im Vergleich zur geringeren LLO-Konzentration ab, ist jedoch immer noch gut zu identifizieren. Außerdem können bei der höheren Konzentration jetzt auch Häufigkeitsgipfel bei  $-120$  pA und  $-160$  pA eindeutig differenziert werden, die einer Leitfähigkeit von  $3000$  pS und  $4000$  pS entsprechen (Abb. 12B). Auch bei Verwendung eines Applikationsvolumens von  $50$   $\mu$ l ( $= 25 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung) und  $150$   $\mu$ l Listeriensuspension ( $= 75 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung) konnten diese Porengrößen gefunden werden, außerdem zeigte sich noch eine Akkumulation der Werte im Bereich von  $3500$  pS (siehe Tab. 3). Diese Ergebnisse bestätigen ebenfalls die Zunahme der Häufigkeit größerer Poren bei höheren Konzentrationen. Somit können LLO-Moleküle eine Grundpore mit einer Leitfähigkeit von etwa  $500$  pS bilden sowie größere Poren, deren Leitfähigkeiten ganzzahlige Vielfache der Leitfähigkeit der Grundpore sind.



### 3.3 Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit der Porenbildung durch eine Listeriensuspension

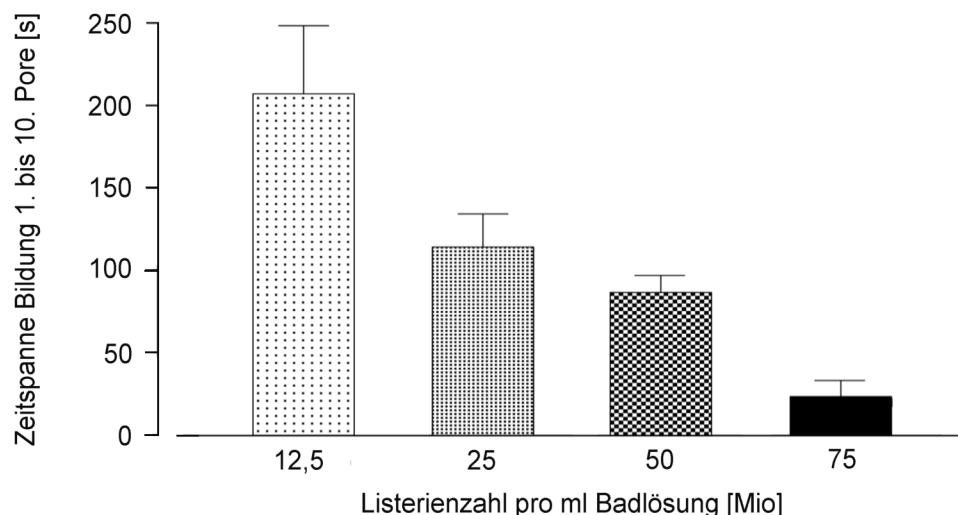
Für das gereinigte Toxin LLO besteht eine steile Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit (Repp et al. 2002). Dies sollte nun auch für die Listeriensuspension überprüft werden. Um die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen vergleichen zu können, wurde als Messparameter diejenige Zeitspanne gewählt, die jeweils ab Bildung der ersten Pore bis zur zehnten Pore verstreicht. Abbildung 13A zeigt den Verlauf der Porenbildung nach Applikation von  $12,5 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung während einer 16-minütigen Registrierungszeit.



**Abb. 13:** (A) Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 25 µl Listeriensuspension (=  $12,5 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung). Die Registrierungsdauer betrug 16 min. (B) Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 150 µl Listeriensuspension (=  $75 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung). Die Registrierungsdauer betrug nur 1,7 min. Das Haltepotenzial lag jeweils bei -40 mV. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Abszissen und Ordinaten in A und B!

Die erste Porenbildung erfolgte ca. 90 s nach Applikation. Die Zeitspanne ab Bildung der ersten Pore bis zur zehnten Pore beträgt ca. 100 s. Im weiteren Verlauf kommt es nicht nur zur Zunahme des Membranstroms durch Porenöffnungen, sondern auch wieder zu Porenschließungen und damit einer Abnahme des Membranstroms, so dass dieser 16 min nach Applikation erst eine Amplitude von ca. -0,25 nA erreichte. In Abbildung 13B sind die Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation einer sechsfach höheren Konzentration dargestellt. Hier erfolgte die erste Porenbildung bereits ca. 15 s nach Applikation. Die weitere Porenbildung zeigte dann einen sehr schnellen Verlauf - bis zur Bildung der zehnten Pore verstrichen nur 15 s - so dass die Membranstromamplitude schon 80 s nach Applikation einen Wert von ca. -1,6 nA erreicht hatte.

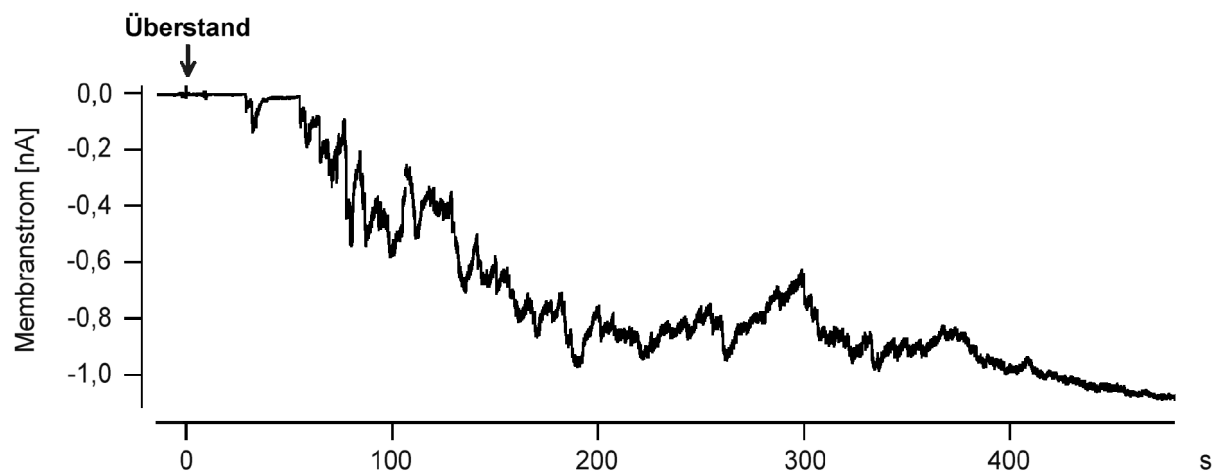
Abbildung 14 stellt die unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeiten von der ersten bis zur zehnten Pore für vier verschiedene Konzentrationen der Listeriensuspension im Balkendiagramm dar. Es zeigt sich eine steile Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit der Listeriensuspension, die mit derjenigen des gereinigten Toxins LLO vergleichbar ist.



**Abb. 14:** Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Porenbildung durch Listeriensuspension. Auf der Ordinate ist die Zeitspanne (s) für die Bildung der ersten bis zur zehnten Pore in der Plasmamembran von HEK293-Zellen dargestellt. Die Abszisse zeigt die jeweils applizierten Konzentrationen der Listeriensuspension. 12,5 x 10<sup>6</sup> Listerien pro ml Badlösung: 207 ± 42 s (n = 4), 25 x 10<sup>6</sup> Listerien/ml: 114 ± 20 s (n = 5), 50 x 10<sup>6</sup> Listerien/ml: 87 ± 10 s (n = 14), 75 x 10<sup>6</sup> Listerien/ml: 23 ± 10 s (n = 3).

### 3.4 Porenbildung durch listerienfreien Überstand

Um zu prüfen, ob das von Listerien in die Suspension sezernierte LLO allein verantwortlich ist für die porenbildende Wirkung, unabhängig von der Anwesenheit der Bakterien, wurde der bakterienfreie Überstand der standardisiert hergestellten Listeriensuspension verwendet (Abschnitt 2.2.2). Bei Applikation von 100  $\mu$ l Überstand kam es nach  $40 \pm 7$  s ( $n = 4$ ) zur ersten Porenbildung (Abb. 15). Die Zeitspanne erste bis zehnte Pore betrug  $67 \pm 17$  s ( $n = 4$ ). Bei Zugabe von 100  $\mu$ l der Listeriensuspension kam es nach  $73 \pm 13$  s ( $n = 14$ ) zur ersten Porenbildung, und es vergingen weitere  $87 \pm 10$  s ( $n = 14$ ) bis zur Bildung der zehnten Pore. Diese Zeitverläufe zeigen im Vergleich keine signifikanten Unterschiede. Die Porenöffnungen und -schließungen zeigten dieselben Charakteristika, wie sie nach Applikation des gleichen Volumens an Listeriensuspension beobachtet werden konnten.

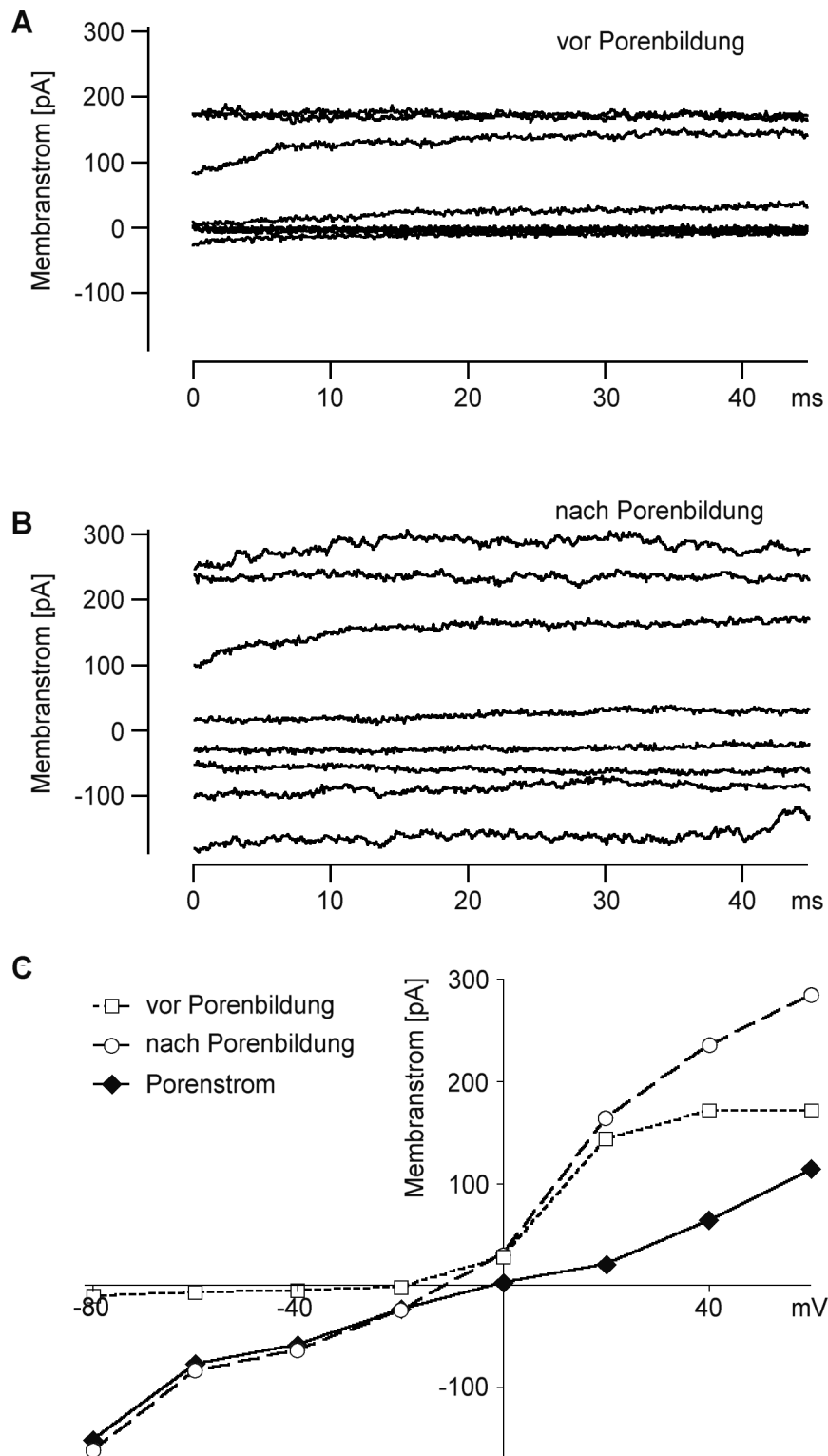


**Abb. 15:** Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 100  $\mu$ l des bakterienfreien Überstandes der Listeriensuspension. Ca. 35 s nach Applikation kommt es zur Bildung der ersten Pore, bis zur Bildung der zehnten Pore vergehen weitere 63 s. Das Haltepotenzial betrug -40 mV.

### 3.5 Umkehrpotenzial des durch Listeriolysin O induzierten Porenstroms

Zur Charakterisierung des durch LLO induzierten Porenstroms wurden Strom-Spannungsbeziehungen des Porenstroms zur Bestimmung seines Umkehrpotenzials gemessen, was Rückschlüsse auf die Art der Ionen zulässt, für die die LLO-Pore permeabel ist. Für diese Messungen wurden 50  $\mu$ l Listeriensuspension zu HEK293-Zellen appliziert und die Membranströme vor und nach einer Porenöffnung bei verschiedenen Membranpotenzialen gemessen. Durch die z.B. in Abbildung 8 dargestellte Abfolge der Porenöffnungen und -schließungen kann sich dieser Membranstrom jedoch fortlaufend ändern. Wir wählten daher eine Sequenz sehr kurzer Spannungssprünge von jeweils 50 ms Dauer, bei der das Membranpotenzial in 20 mV-Schritten von -80 mV bis auf +60 mV ohne Zwischenschaltung eines Haltepotenzials verändert wurde. Eine solche Sequenz mit acht verschiedenen Membranpotenzialen von insgesamt 400 ms Dauer wiederholte sich 2,5 mal pro Sekunde. Für eine Mittelwertbildung der Membranströme war es außerdem wichtig, dass diese schnelle Pulsabfolge eine dreimalige Registrierung der Membranströme während einer Porenöffnung zuließ, ohne dass sich in diesem Zeitraum eine Pore wieder schloss oder eine Pore sich zusätzlich öffnete. Die einzelne Pore musste somit für eine Dauer von mindestens 1,2 s geöffnet bleiben. Für die Messung des Umkehrpotenzials des Porenstroms wurden nur die Messdaten der ersten drei Poren nach Porenbildung herangezogen.

In Abbildung 16 sind Originalregistrierungen vor (Abb. 16A) und nach (Abb. 16B) Bildung einer ersten Pore dargestellt. Sowohl in Abbildung 16A als auch in der entsprechenden Strom-Spannungskurve (Abb. 16C) erkennt man deutlich die schon in Abschnitt 3.1 beschriebene charakteristische Strom-Spannungsbeziehung der HEK293-Zelle mit Aktivierung der spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle ab einem Membranpotenzial von -30 mV. Abbildung 16B zeigt die Membranströme der HEK293-Zelle nach Bildung einer ersten Pore und in Abbildung 16C ist die entsprechende Strom-Spannungsbeziehung dargestellt. Nach der Porenöffnung zeigt der Verlauf der Strom-Spannungskurve jetzt eine mehr lineare Charakteristik, wobei der spannungsabhängige  $K^+$ -Strom als Überlagerung deutlich zu sehen ist.



**Abb. 16:** (A) Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 50  $\mu$ l Listeriensuspension vor Beginn der Porenbildung. Das Membranpotenzial wurde in 20 mV-Schritten von -80 mV bis +60 mV verändert. Die Registrierung zeigt einen Ausschnitt von 45 ms der ursprünglich 50 ms langen Pulse. Die Membranstromamplituden wurden jeweils am Ende der 50 ms dauernden Spannungspulse im Zeitintervall zwischen 38,5 bis 45 ms gemessen. Verwendet wurden physiologische  $E_{Cl}$ -Lösung und

IBL<sub>100</sub> (Abschnitt 2.3.4). Die Umkehrpotenziale lassen sich aus den Strom-Spannungsbeziehungen der Membranströme bestimmen. **(B)** Membranströme derselben HEK293-Zelle nach Öffnung der ersten Pore. **(C)** Aus der Originalregistrierung ermittelte Strom-Spannungsbeziehung vor ( $\square$ ) und nach ( $\circ$ ) Bildung der ersten Pore. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus drei Pulssequenzdurchläufen. Aus der Differenz ergibt sich die Strom-Spannungsbeziehung des Porenstroms ( $\diamond$ ). Der Porenstrom zeigt eine annähernd lineare Strom-Spannungsbeziehung mit einem Umkehrpotenzial nahe 0.

Durch Subtraktion des vor Porenbildung gemessenen Membranstroms von dem registrierten Membranstrom nach Porenbildung erhält man den Porenstrom für die jeweilige Porenöffnung. Er hat eine lineare Strom-Spannungscharakteristik (Abb. 16C). Das Umkehrpotenzial dieses Porenstroms wurde mittels Regressionsanalyse im Bereich von -20 mV bis +20 mV ermittelt. Es betrug  $0,9 \pm 0,9$  mV ( $n = 11$ ). Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von Null. Da der Porenstrom bei den für diese Messungen verwendeten physiologischen Lösungskombinationen hauptsächlich von den monovalenten Kationen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  getragen wird, bedeutet ein Umkehrpotenzial von Null, dass die Leitfähigkeiten der Pore für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  gleich sind. Es handelt sich also zumindest um einen unspezifischen monovalenten Kationenstrom.

Anhand der Strom-Spannungsbeziehung des Porenstroms (Abb. 16C) lässt sich aus der Steigung dieser Strom-Spannungsbeziehung die elementare Leitfähigkeit der einzelnen Pore berechnen. Der Mittelwert aller so errechneten Leitfähigkeiten betrug  $2545 \pm 370$  pS ( $n = 11$ ). Dabei stellten die einzelnen Werte, die bei etwa 500 pS, 1000 pS, 2000 pS und 4000 pS lagen, wieder die Grundpore und deren ganzzahlige Vielfache dar, wie es schon in Abschnitt 3.2.2 für die elementaren Porenströme beschrieben wurde. Um festzustellen, ob die einzelnen LLO-Poren für den Einwärts- bzw. Auswärtsstrom unterschiedliche Leitfähigkeiten aufweisen, wurden die Leitfähigkeiten der einzelnen Porenströme getrennt für den positiven und negativen Potenzialbereich ermittelt. Es zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied in den Leitfähigkeiten der LLO-Poren für den Einwärts- bzw. Auswärtsstrom.

### 3.6 $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch Listeriolysin O-Poren

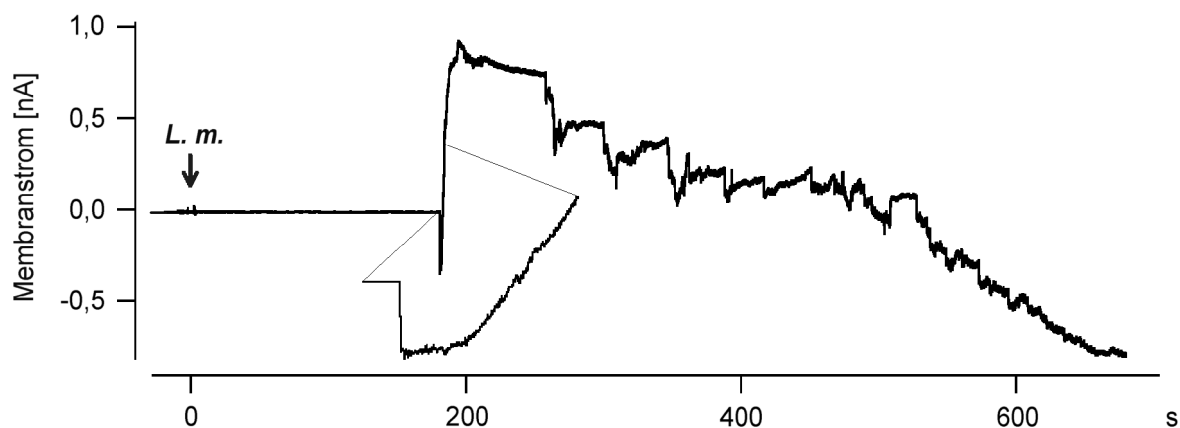
Wie im vorigen Abschnitt gezeigt, sind die durch LLO gebildeten Poren unselektiv permeabel zumindest für monovalente Kationen wie  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$ . Als nächstes interessierte uns die Frage, ob die Poren auch eine Permeabilität für divalente Kationen aufweisen.

Wadsworth und Goldfine (1999) zeigten an J774-Zellen, einer makrophagen-ähnlichen Zelllinie, dass es ca. 1 min nach Applikation einer Listeriensuspension zu einer schnellen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) kommt. Nach Rückgang auf den Ausgangswert innerhalb von 2 min kommt es ca. 5 min nach Zugabe der Listeriensuspension zu einer zweiten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung mit erneutem Rückgang auf den Ausgangswert innerhalb von 10 min. Ca. 15 min nach Applikation erfolgt eine dritte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung mit Rückgang auf den Ausgangswert innerhalb von 40 min. Es wurde postuliert, dass die erste  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung allein durch den Influx von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch endogene, rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zustande komme und die zweite und dritte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung sowohl aufgrund eines Einstroms von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  als auch durch die Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern erfolge. Laut Wadsworth und Goldfine konnten alle drei  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhungen nach Inkubation der J774-Zellen mit dem Blocker für rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle SK&F 96365 (Rink 1990) nicht mehr registriert werden.

In unserer Arbeitsgruppe sind ebenfalls Experimente durchgeführt worden, um Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Applikation einer Listeriensuspension zu untersuchen (Repp et al. 2002). Für diese Messungen wurden HEK293-Zellen verwendet, die mit dem Gen für den humanen  $\text{K}^+$ -Kanal kleiner Leitfähigkeit Nr. 4 (hSK4-Kanal) stabil transfiziert wurden und die entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle in ihrer Zellmembran aufweisen (Joiner et al. 1997). Eine sofort messbare, funktionelle Konsequenz eines intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstiegs ist die Aktivierung dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle. Der in diesen HEK293hSK4-Zellen exprimierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanal hSK4 kann quasi als Messsonde für intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen dienen.

Abbildung 17 zeigt den Membranstrom einer solchen HEK293hSK4-Zelle bei einem Haltepotenzial von -40 mV. Ca. 180 s nach Applikation der Listerien-

suspension kommt es zunächst durch die erste Porenbildung zu einem negativen Membranstrom. Noch während die Pore geöffnet ist, kommt es zu einem ins Positive gehenden Membranstrom, der durch die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle getragen wird (Vergrößerung in Abb. 17). Nach der schnellen Aktivierung kommt es innerhalb von 5 min zur Inaktivierung des  $\text{K}^+$ -Stroms. Dieser  $\text{K}^+$ -Strom wird überlagert von Porenströmen der stetig fortschreitenden Porenbildung, so dass im Zeitverlauf der Gesamtmembranstrom einen negativen Wert annimmt.



**Abb. 17:** Zeitverlauf des Membranstroms einer HEK293hSK4-Zelle nach Applikation von 50  $\mu\text{l}$  Listeriensuspension. Das Haltepotenzial betrug -40 mV. Die Vergrößerung zeigt den Beginn der Porenbildung mit konsekutiver Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms in einer höheren Zeitauflösung von 5 s Dauer.

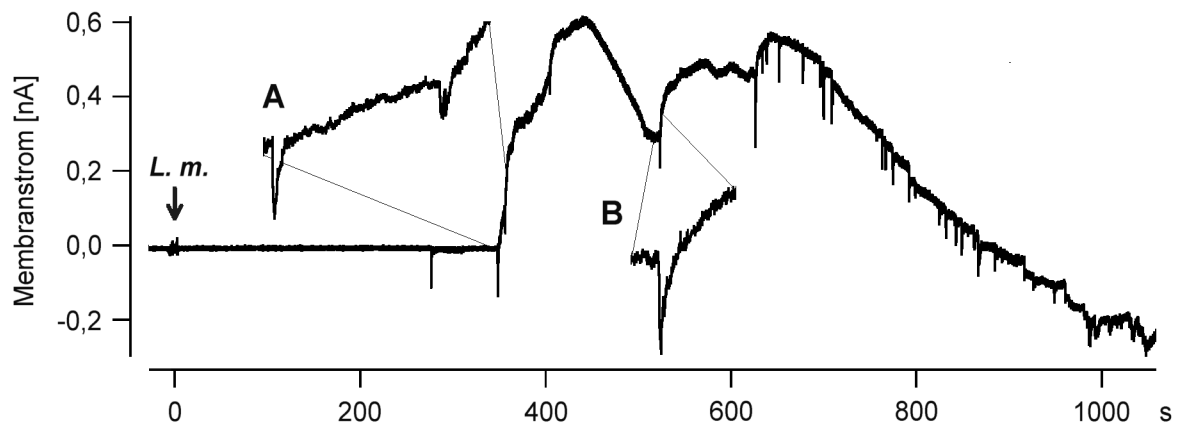
Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die LLO-induzierte Porenbildung in HEK293hSK4-Zellen zu einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg mit nachfolgender Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle kommt. Es muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass in ca. 30% dieser Messungen die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle nicht sofort nach Bildung der ersten Pore erfolgte, sondern erst nach der zweiten oder dritten Porenbildung. Dies könnte daran liegen, dass das durch die erste Pore einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  nicht ausreichte, um den zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle notwendigen Schwellenwert zu erreichen. Möglich wäre jedoch auch, dass die Bildung der LLO-Pore und damit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom an einer Stelle der Plasmamembran der HEK293hSK4-Zelle stattfand, an der gerade keine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle in der Membran lokalisiert waren. Außerdem stellte sich in diesen Experimenten heraus, dass nach Applikation von



Listeriensuspensionen mit geringerer Bakterienzahl in Abhängigkeit von der Konzentration in bis zu 60% der Messungen zwar noch eine Porenbildung zu registrieren war, die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle jedoch völlig ausblieb.

In weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Austausch von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $\text{Ba}^{2+}$  dazu führte, dass nach Applikation einer Listeriensuspension zwar noch die Porenbildung in der Zellmembran der HEK293hSK4-Zellen stattfand, es jedoch nicht mehr zur Aktivierung der exprimierten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle kam (Repp et al. 2002). Durch das Fehlen des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  war offensichtlich ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg nicht mehr möglich. Dies war ein Hinweis darauf, dass es durch die Applikation von LLO zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit konsekutivem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kam, der entweder direkt und/oder durch zusätzliches Freisetzen aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle aktivierte. Ob dieser Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle durch endogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle oder direkt durch die LLO-Poren erfolgte, sollte durch die folgenden Messungen geklärt werden.

Ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg über endogene, spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ist unwahrscheinlich, da das Membranpotenzial bei -40 mV gehalten wurde und hier noch keine Aktivierung der in HEK293-Zellen beschriebenen spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle stattfindet (Berjukow et al. 1996). Dennoch wurden Experimente mit den klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern Verapamil (10  $\mu\text{M}$ ) als Blocker vor allem für L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Striessnig et al. 1998) und Cadmium (1 mM), einem Blocker für alle spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Randall 1998), durchgeführt (nähere Erläuterungen zu den einzelnen Substanzen siehe Abschnitt 2.5). Zusätzlich sollte die von Wadsworth und Goldfine (1999) aufgestellte Hypothese überprüft werden, dass an diesem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beteiligt seien. Aus diesem Grunde wurde der Extrazellulärlösung neben Verapamil und Cadmium auch der Blocker für rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle SK&F 96365 (25  $\mu\text{M}$ ) (Rink 1990) zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Applikation der Listeriensuspension.



**Abb. 18:** Membranströme einer HEK293hSK4-Zelle nach Applikation von 50  $\mu$ l Listeriensuspension. Die endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle dieser Zelle wurden durch 10-minütige Inkubation mit  $\text{CdCl}_2$  (1 mM), SK&F 96365 (25  $\mu$ M) und Verapamil (10  $\mu$ M) geblockt. Ca. 280 s nach Applikation der Listeriensuspension kam es zu einer ersten Porenbildung, die jedoch nicht ausreichte, um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Strom zu aktivieren. Ca. 60 s später kam es zur zweiten Porenbildung mit sofortiger transienter Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle (Vergrößerung **(A)**). **(B)** Weitere Bildung einer LLO-Pore mit nachfolgender Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms in höherer Zeitauflösung. Das Haltepotenzial betrug -40 mV.

Abbildung 18 zeigt eine Originalregistrierung der Membranströme einer HEK293hSK4-Zelle. In diesem Experiment kam es nach Bildung der zweiten Pore zu einer sofortigen, transienten Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen mit positiven Membranströmen (Vergrößerung A). Dabei zeigte sich während der Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms eine immer wieder stattfindende Porenbildung durch LLO. Nach Erreichen des Amplitudenmaximums von ca. 0,6 nA kam es zunächst zu einer leichten Inaktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms auf ca. 0,3 nA, bis dann eine weitere Porenbildung zur erneuten Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle führte (Vergrößerung B). Nachdem es danach noch ein drittes Mal zu einer leichten Aktivierung kam, folgte die endgültige Inaktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle. Der Membranstrom ging nun durch die stetig fortschreitende Porenbildung in den negativen Strombereich über. Von sieben Experimenten, in denen Cadmium, Verapamil und SK&F 96365 gleichzeitig in der Extrazellulärlösung vorhanden waren, war in fünf Experimenten der gleiche Stromverlauf zu registrieren. Bei zwei Messungen kam es nur zur Porenbildung durch LLO ohne Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen. In den fünf Experimenten, in denen es zu einer Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle kam, erreichten die Membranströme

eine mittlere Amplitude von  $0,6 \pm 0,2$  nA ( $n = 5$ ), die der entsprach, die bei Messungen ohne die entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker in der Extrazellulärlösung registriert wurde. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der von uns postulierte Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  nicht über endogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, sondern direkt über die LLO-Poren erfolgt und offenbar eine entscheidende Rolle für den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg spielt.

Vor Durchführung der oben beschriebenen Experimente mit mehreren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern führten wir aufgrund der bereits erwähnten Publikation von Wadsworth und Goldfine (1999) zuerst Messungen durch, in denen HEK293-Zellen alleine mit dem Blocker für rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle SK&F 96365 inkubiert worden waren. Es sollte überprüft werden, ob SK&F 96365 einen Einfluss auf die Porenbildung hat. Die HEK293-Zellen wurden für 5 min mit SK&F 96365  $10 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) und  $25 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) inkubiert. Dann wurden  $100 \mu\text{l}$  Listeriensuspension appliziert. Die Zeitspanne von der ersten bis zur zehnten Porenbildung betrug bei Inkubation mit SK&F 96365 ( $10 \mu\text{M}$ )  $64 \pm 3$  s ( $n = 3$ ) und bei SK&F 96365 ( $25 \mu\text{M}$ )  $35 \pm 5$  s ( $n = 3$ ). Bei nicht mit SK&F 96365 inkubierten Zellen betrug diese Zeitspanne  $87 \pm 10$  s ( $n = 14$ ). Die Porenbildung erfolgte somit bei Zellen, die mit SK&F 96365 ( $25 \mu\text{M}$ ) inkubiert worden waren, signifikant schneller als bei nicht inkubierten Zellen ( $p = 0,037$ ). Auch der Vergleich der beiden Messreihen mit unterschiedlich konzentriertem SK&F 96365 zeigte einen signifikanten Unterschied in der Geschwindigkeit der Porenbildung ( $p = 0,0059$ ).

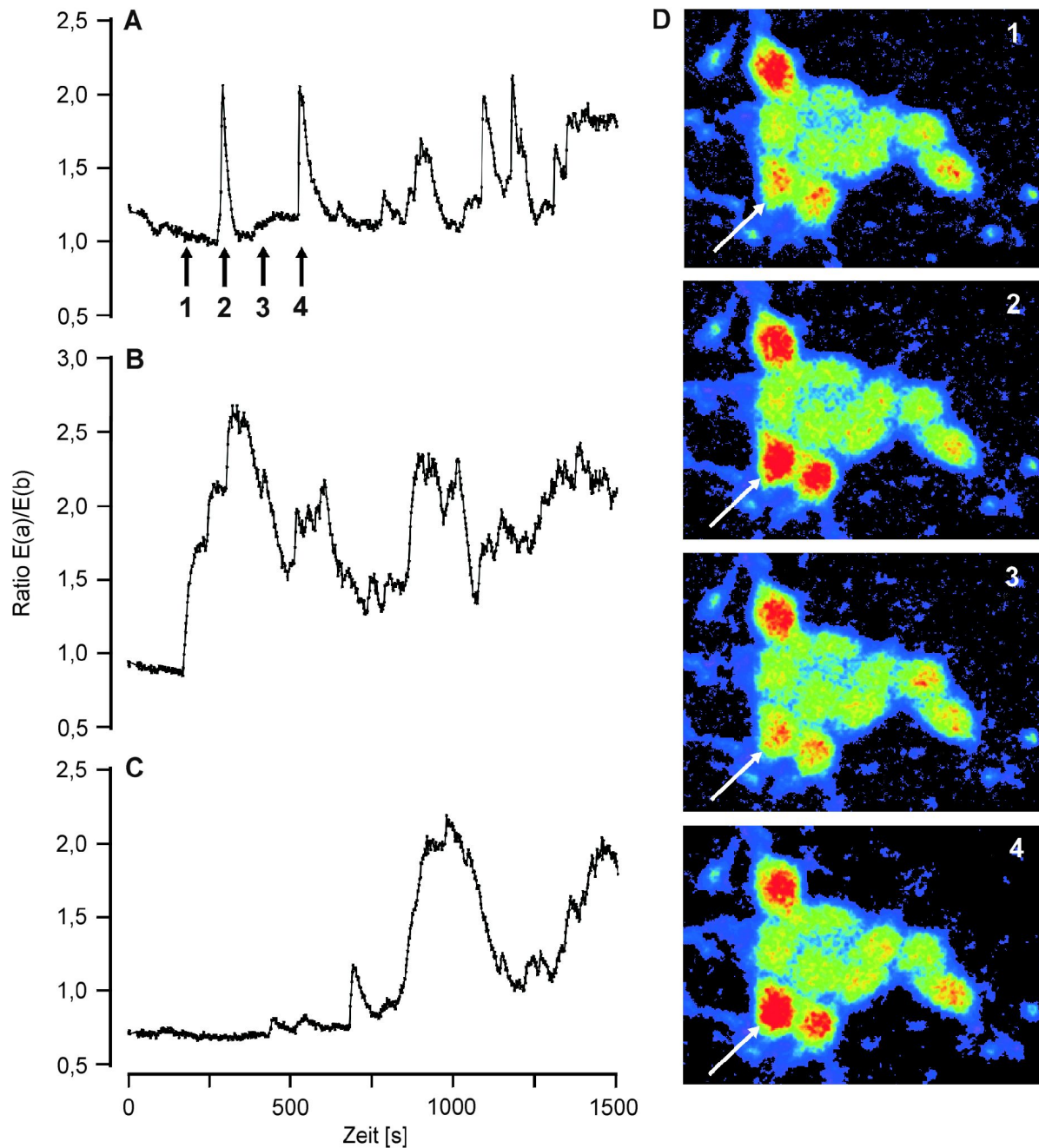
Als Nebeneffekt zeigte sich überraschenderweise, dass der angeblich spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker SK&F 96365 schon in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  den  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen, spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Strom, der ab einem Membranpotenzial von  $-30$  mV aktiviert, in HEK293-Zellen blockiert, vergleichbar mit der Wirkung von TEA ( $5\text{mM}$ ) (Abschnitt 3.1).

### 3.7 Listeriolysin O induziert $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in HEK293-Zellen

Mit den in Abschnitt 3.6 dargestellten Experimenten konnte indirekt nachgewiesen werden, dass es nach Applikation der Listeriensuspension zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch LLO-Poren und damit zu Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und um einen direkten Nachweis zu liefern, führten wir nun Experimente mit HEK293-Zellen durch, die vor den Messungen mit dem fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Indo 1-AM inkubiert worden waren (Abschnitt 2.4). Dieses Fluorochrom bindet  $\text{Ca}^{2+}$  und ändert dabei - abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration - seine Fluoreszenzeigenschaften. Der Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop in Form von Zeitrafferaufnahmen dokumentiert (Abb. 19D), die nach Ratiobildung (Abschnitt 2.4) in der in Abb. 19A-C gezeigten Form dargestellt werden können.

Einige Minuten nach Applikation der Listeriensuspension kam es zu einem intrazellulären Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit oszillierendem Verlauf. Abbildungen 19A-C stellen Originalmessungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen an drei verschiedenen HEK293-Zellen dar. Es wurden zwei Formen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen beobachtet, deren Auftreten zwischen den einzelnen Zellen variierte. In einem Teil der Zellen kam es vorwiegend zu kurzen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsspitzen mit jeweils schnellem Rückgang auf den Ausgangswert (Abb. 19A). In einem anderen Teil der Zellen fanden sich überwiegend langsame  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen mit einer eher wellenförmigen Zu- und Abnahme (Abb. 19B, C). Abbildung 19D zeigt die korrespondierenden Fluoreszenzbilder zu der in Abbildung 19A dargestellten Registrierung. Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch einen Farbumschlag vom Grünen ins Rote dargestellt. Deutlich erkennt man die durch Öffnen und Schließen von LLO-Poren bedingten Oszillationen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Effekte konnten auch durch die Applikation von gereinigtem LLO ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ) gezeigt werden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigten sich kontinuierlich während einer Aufnahmezeit von 1 h.

Nach Austausch von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Extrazellulärlösung durch  $\text{Ba}^{2+}$  traten nach Applikation der Listeriensuspension keine intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen mehr auf. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen durch einen Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch LLO-Poren verursacht werden.



**Abb. 19: (A) - (C):** Originalregistrierungen der durch Porenbildung induzierten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Oszillationen. Die Listeriensuspension wurde zu Beginn der Zeitmessung auf die mit Indo 1-AM beladenen HEK293-Zellen appliziert. Dargestellt werden die zeitlichen Verläufe der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen drei verschiedener HEK293-Zellen.  $E(a)$  = Emission bei 405 nm,  $E(b)$  = Emission bei 460 nm. **(D)** Fluoreszenzbilder der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Oszillationen. Erhöhungen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration werden durch einen Farbumschlag vom Grünen ins Rote dargestellt. Im Original wurden Graustufenbilder im Abstand von 2 s aufgenommen und dann in die hier gezeigten Falschfarbenbilder konvertiert. Die in **(A)** gezeigte Registrierung wurde von der in **(D)** mit weißem Pfeil markierten Zelle durchgeführt. Die Pfeile 1-4 unterhalb der in **(A)** dargestellten Registrierung markieren die Zeitpunkte, an denen die entsprechenden Bilder aufgenommen wurden.

### 3.8 Bedeutung intrazellulär gespeicherten $\text{Ca}^{2+}$ bei der Aktivierung $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger $\text{K}^+$ -Kanäle in HEK293hSK4-Zellen

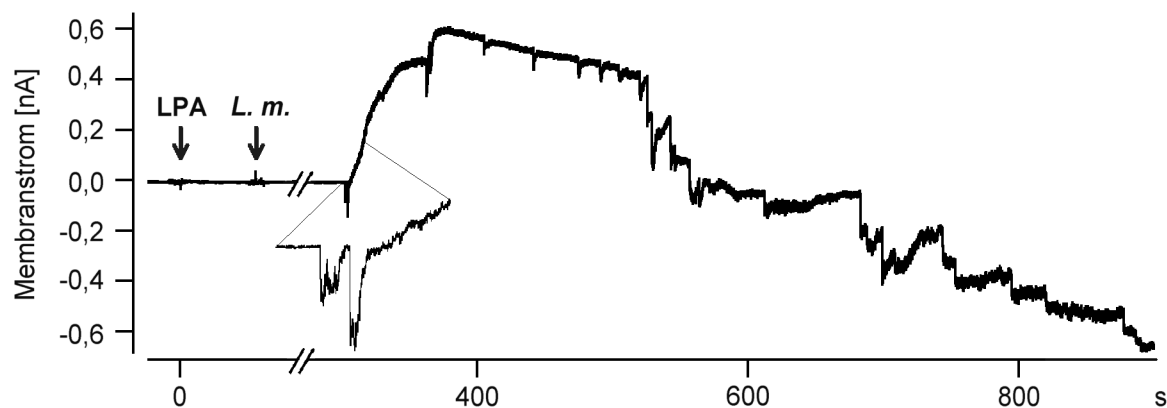
Die bisher durchgeführten Messungen zeigten, dass nach Applikation der Listeriensuspension ein Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch in der Plasmamembran entstandene LLO-Poren stattfindet, der zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen in HEK293hSK4-Zellen führt. Es ist jedoch noch nicht bekannt, inwieweit das intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeicherte  $\text{Ca}^{2+}$ , das u.a. durch den Einstrom von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen freigesetzt werden kann, zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle beiträgt.

Aus früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass die mitogene Substanz Lysophosphatidsäure (LPA) (Abschnitt 2.5) an HEK293hSK4-Zellen zu einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung mit konsekutiver Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Ströme führt (Decker 1999). Messungen an NIH3T3-Mäusefibroblasten, die den entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanal endogen exprimieren und eine ähnliche Aktivierungskaskade aufweisen, zeigten nach LPA-Applikation - trotz einer nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Extrazellulärlösung - noch eine 25%ige Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Ströme (Repp et al. 1998). Dies ließ vermuten, dass auch intrazellulär gespeichertes  $\text{Ca}^{2+}$  durch eine LPA-aktivierte Signalkaskade aus dem ER freigesetzt werden könnte.

Um das im ER gespeicherte  $\text{Ca}^{2+}$  zu entfernen, wurden die für die Messungen verwendeten HEK293hSK4-Zellen vor Messbeginn eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  mit Thapsigargin ( $10\ \mu\text{M}$ ) inkubiert. Thapsigargin ist ein sehr spezifischer Blocker der in der Membran des ER vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (SERCAs = Sarco-/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen sorgen für die ständige Wiederauffüllung des ER mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Thapsigargin verhindert die Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das ER, was schließlich zu einer Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher führt (Darbha & Marchase 1996; Nofer et al. 1997). Dadurch kann nach Thapsigarginbehandlung auf Signale, die normalerweise zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER führen, keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung mehr erfolgen. Das nach Entleerung des ERs frei vorliegende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch plasmamembranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (PMCAs) schnell aus der Zelle hinausgepumpt (Berridge et al. 1998; Bootman et al. 2001).

Am Messstand wurden die Zellen mehrere Male mit Extrazellulärlösung ( $E_1$ ) gespült, um das Thapsigargin aus dem Extrazellulärraum zu entfernen. Als Pipettenlösung wurde eine  $Ca^{2+}$ -freie Intrazellulärlösung ( $IBL_0$ ) verwendet (Abschnitt 2.3.4). Nach Erstellen des Whole-Cell-Messmodus kommt es innerhalb kurzer Zeit ( $< 1$  min) zu einem Austausch des Zytoplasmas durch die Pipettenlösung (Neher & Sakmann, 1995). So konnte ein weitgehend  $Ca^{2+}$ -freies intrazelluläres Milieu erreicht werden. Die endogenen  $Ca^{2+}$ -Kanäle wurden durch Zugabe der  $Ca^{2+}$ -Kanalblocker Verapamil ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ) und Cadmium ( $1\text{mM}$ ) in die Extrazellulärlösung blockiert.

Abbildung 20 zeigt, dass es unter unseren Messbedingungen nach LPA-Applikation zu keiner Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanäle kam. Dies lässt den Schluss zu, dass die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch die Thapsigarginbehandlung, die Blockade der endogenen  $Ca^{2+}$ -Kanäle und die Verwendung nominell  $Ca^{2+}$ -freier Intrazellulärlösung so stark abgesunken war, dass sie unterhalb der zur Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanäle notwendigen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationschwelle blieb.



**Abb. 20:** Membranströme einer HEK293hSK4-Zelle nach Applikation von LPA ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ) und anschließender Zugabe von  $50\text{ }\mu\text{l}$  Listeriensuspension. Nach LPA-Gabe erfolgte keine Aktivierung der Membranströme. Nach Applikation der Listeriensuspension kam es nach Bildung der zweiten Pore zur Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanäle (siehe Vergrößerung) mit einer Stromamplitude von zunächst ca.  $450\text{ pA}$ . Nach Öffnen der nächsten Pore erfolgte eine weitere Aktivierung auf ca.  $600\text{ pA}$ . Die Bildung vieler aufeinander folgender Poren führte schließlich zu einer Abnahme der Membranströme, so dass der Gesamtmembranstrom einen negativen Wert annahm. Das Haltepotenzial lag bei  $-40\text{ mV}$ .

Nachdem die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle nach LPA-Gabe nicht aktiviert hatten, wurden 50  $\mu\text{l}$  Listeriensuspension appliziert. Bei sechs Messungen kam es fünfmal zur Porenbildung mit nachfolgender Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle, wobei der Mittelwert der  $\text{K}^+$ -Stromamplitude bei  $0,6 \pm 0,2 \text{ nA}$  ( $n = 5$ ) lag und sich somit nicht von dem unterschied, der bei vergleichbaren Messungen ohne Thapsigargin gewonnen wurde (Abschnitt 3.6). Bei einer Messung kam es nur zur Porenbildung ohne Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Strömen.

Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass das von extrazellulär durch die LLO-Poren einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Strom aktiviert und dass das intrazellulär vorhandene  $\text{Ca}^{2+}$  nicht essentiell für die Kanalaktivierung ist.

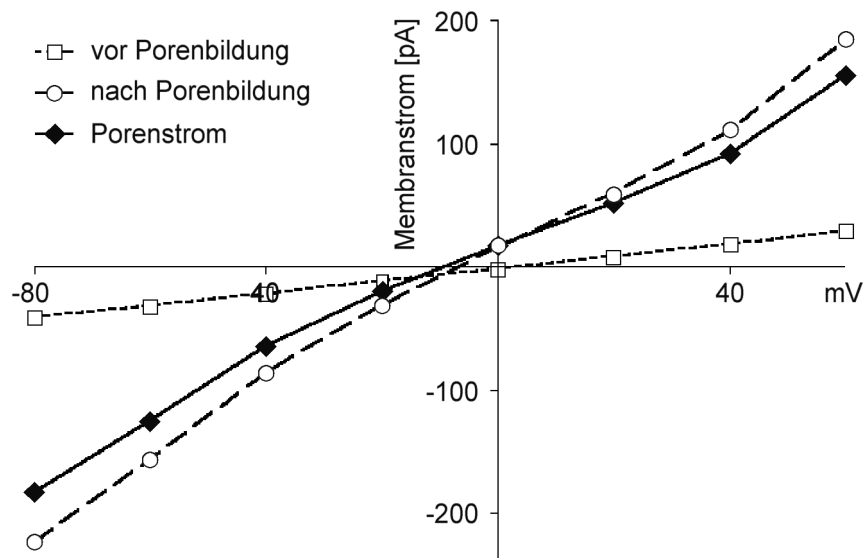
### **3.9 Einfluss von TEA auf das Umkehrpotenzial des Porenstroms**

Die bisher vorgestellten Ergebnisse hatten gezeigt, dass die LLO-Poren zumindest permeabel für monovalente Kationen wie  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  und für divalente Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Ba}^{2+}$  sind. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen wird die Größe der LLO-Pore mit einem Durchmesser von ca. 20 bis 30 nm angegeben, wobei bei diesen Experimenten sehr hohe LLO-Konzentrationen eingesetzt wurden (Jacobs et al. 1999). Mit diesem Wert ist jedoch nur der von außen auf der Zellmembran sichtbare Durchmesser der Pore angegeben. Wie groß der innerhalb der Lipid-Doppelschicht liegende Durchmesser der LLO-Pore ist, konnte bisher nicht gezeigt werden. Deshalb sollte nun überprüft werden, ob die LLO-Pore auch für größere Moleküle wie Tetraethylammonium (TEA) permeabel ist. Dazu wurde in der Extrazellulärlösung NaCl durch TEA-Chlorid und in der Intrazellulärlösung  $\text{K}^+$ -Glutamat durch KCl ersetzt und dann das Umkehrpotenzial des Porenstroms gemessen.

Abbildung 21 zeigt die Strom-Spannungsbeziehung des Membranstroms vor und nach Porenbildung mit der daraus resultierenden Strom-Spannungsbeziehung für den Porenstrom. Anhand der Strom-Spannungsbeziehung vor Porenöffnung sieht man, dass es durch TEA, wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, zu einer Blockade des spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms in der HEK293-Zelle kommt (Abschnitt 3.1). Der Porenstrom zeigt eine annähernd lineare Strom-Spannungscharakteristik. Das Umkehrpotenzial wurde mittels Regressionsanalyse im Bereich von -20 mV bis



+20 mV ermittelt. Der Mittelwert aus sieben entsprechenden Experimenten beträgt mit den oben erwähnten veränderten Ionenlösungen  $-8,4 \pm 0,7$  mV. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0 ( $p < 0,0001$ ).



**Abb. 21:** Strom-Spannungsbeziehung vor ( $\square$ ) und nach ( $\circ$ ) Bildung von LLO-Poren nach Applikation einer Listeriensuspension. In der Extrazellulärlösung waren Glucose, HEPES und TEA-Chlorid vorhanden, die Intrazellulärlösung enthielt HEPES und KCl (Abschnitt 2.3.4). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus drei Pulssequenzdurchläufen. Aus der Differenz der Stromamplitude vor und nach Porenbildung ergibt sich die Strom-Spannungsbeziehung des Porenstroms ( $\blacklozenge$ ).

Das Membranpotenzial der Zelle setzt sich aus den Umkehrpotenzialen und Leitfähigkeiten aller die Zellmembran passierenden Ionen zusammen. Da Chlorid in identischer Konzentration in der Extra- und Intrazellulärlösung vorlag, liegt dessen Umkehrpotenzial bei 0. Somit können nur noch  $K^+$  und TEA-Ionen mit ihren unterschiedlichen Umkehrpotenzialen zu einem von Null abweichenden Membranpotenzial beitragen, wenn sie unterschiedliche Permeabilitäten bzw. Leitfähigkeiten für die LLO-Pore haben. Die Verschiebung des Umkehrpotenzials von 0 auf -8,4 mV, d.h. ins Negative, lässt daher den Schluss zu, dass die Permeabilität für  $K^+$  höher ist als für TEA-Ionen. Dies deutet darauf hin, dass die LLO-Pore für  $K^+$  im Vergleich zu TEA eine - wenn auch geringe - Selektivität zeigt.

Im Hinblick auf die Porengröße zeigen die Experimente mit TEA, dass die LLO-Poren nicht nur für monovalente Ionen wie  $K^+$  und  $Na^+$  und divalente Ionen wie  $Ca^{2+}$

und  $\text{Ba}^{2+}$  permeabel sind, sondern dass auch größere Moleküle wie TEA (Ionenradius = 0,36 nm) - wenn auch mit einer gewissen Einschränkung im Vergleich zu  $\text{K}^+$  (Ionenradius = 0,13 nm) und  $\text{Na}^{2+}$  (Ionenradius = 0,10 nm) - durch die LLO-Poren hindurchströmen können.

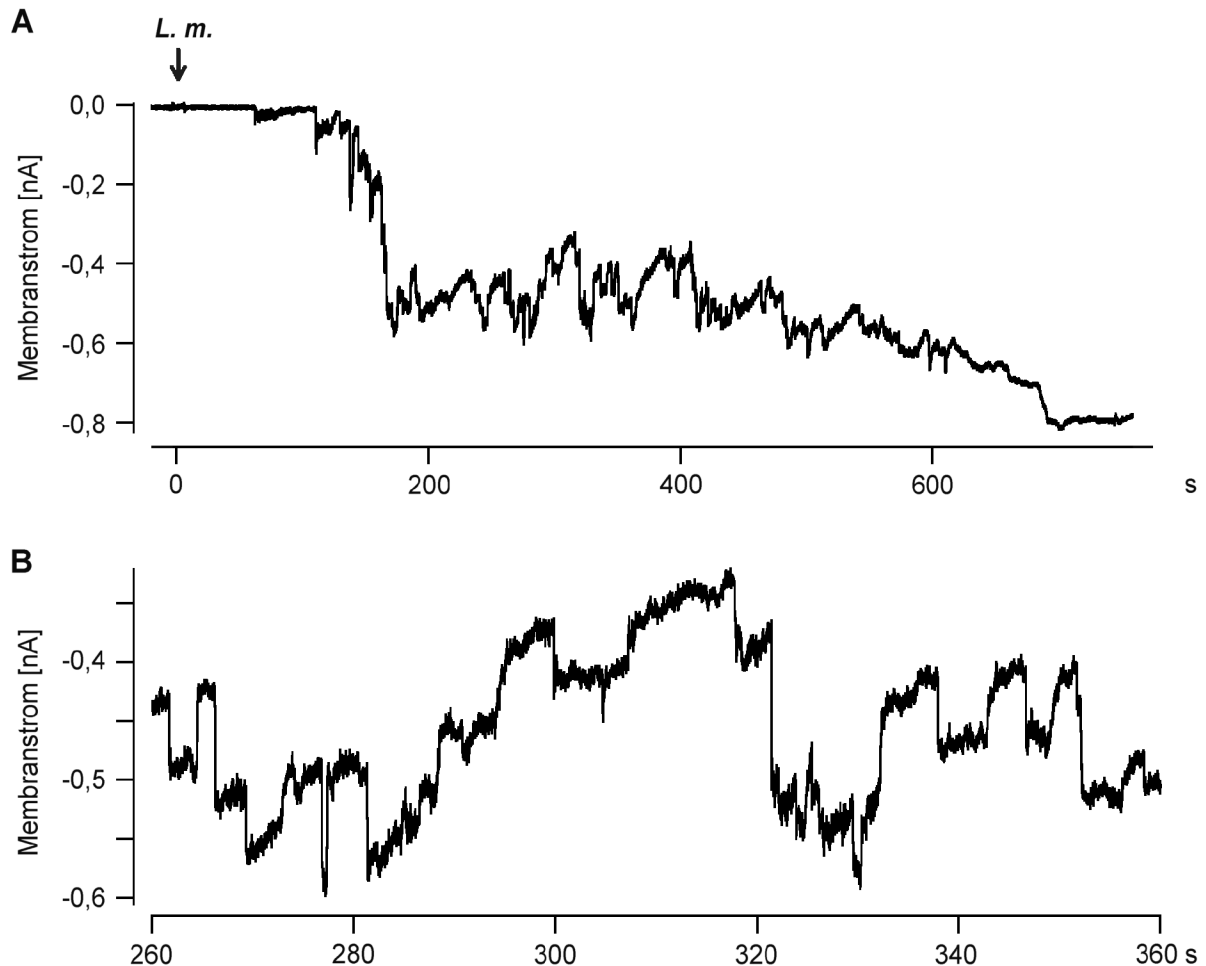
### **3.10 Einfluss des pH-Wertes auf die Porenbildung**

Das pH-Optimum für die lytische Aktivität von LLO liegt bei 5,5. Diese Aktivität variiert im pH-Bereich von 4,5 bis 6,5 nur geringfügig (Vázquez-Boland et al. 2001). Das niedrige pH-Optimum entspricht der Funktion von LLO im sauren Milieu der Vakuolen, in denen die Listerien nach Invasion der Wirtszellen vorliegen und deren Membran sie durch die Sekretion von LLO zerstören. Beauregard et al. (1997) zeigten, dass die Lyse dieser Vakuolen ein pH-abhängiger Prozess ist. Die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich scheint die Aktivität von LLO zu erhöhen und somit die Lyse der Vakuole zu beschleunigen.

Aus diesem Grund wurden Messungen bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,5 anstatt - wie normalerweise - von 7,35 durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob die Erniedrigung des pH-Wertes die Effektivität von LLO erhöht und somit die Porenbildung verstärkt. Der pH-Wert wurde auf 6,5 festgelegt, da es bei niedrigeren pH-Werten zu einer Schädigung der HEK293-Zellen kam und somit die Patch-Clamp-Technik nicht problemlos angewendet werden konnte. Die HEK293-Zellen wurden am Messstand für 10 min mit der auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellten Extrazellulärlösung (Abschnitt 2.3.4) inkubiert, bevor 100  $\mu\text{l}$  Listeriensuspension appliziert wurden.

Abbildung 22 zeigt eine typische Originalregistrierung aus dieser Messreihe. In dem sauren extrazellulären Milieu zeigten die HEK293-Zellen bei einem Haltepotenzial von -40 mV einen Grundstrom von  $-24,3 \pm 10,9$  pA ( $n = 6$ ). Das Ruhemembranpotenzial betrug  $-25,8 \pm 2,8$  mV ( $n = 6$ ). Nach Applikation der Listeriensuspension vergingen bis zur ersten Porenbildung  $71 \pm 19$  s ( $n = 6$ ), die Zeitspanne ab Bildung der ersten Pore bis zur zehnten Porenbildung betrug  $103 \pm 21$  s ( $n = 6$ ). Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den Ergebnissen, die bei einem physiologischen pH-Wert von 7,35 gemessen wurden (siehe Abschnitt 3.3). Die

Verschiebung des pH-Wertes auf 6,5 führte auch nicht zu Veränderungen im Öffnungs- und Schließungsverhalten der einzelnen Poren (vergleiche hierzu Abb. 22B mit Abb. 8).

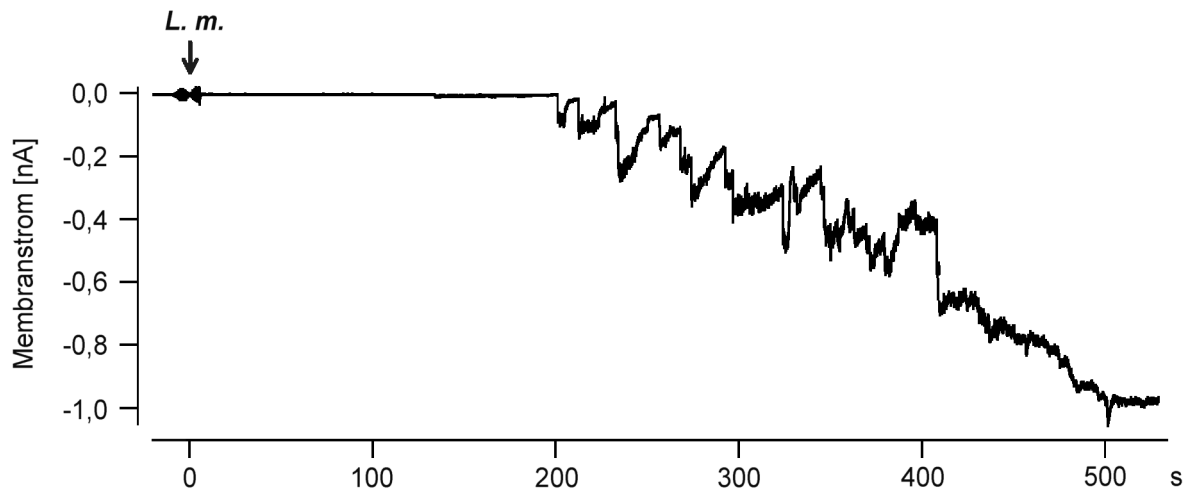


**Abb. 22:** (A) Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 100 µl Listeriensuspension. Die Extrazellulärlösung war auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Das Haltepotenzial betrug -40 mV. Die erste Porenbildung erfolgte ca. 60 s nach Applikation. Bis zur Bildung der zehnten Pore vergingen weitere 110 s. Durch die stetig fortschreitende Porenbildung erreichte der Membranstrom nach 12 min eine Amplitude von -0,8 nA. (B) Ausschnitt der in (A) dargestellten Registrierung in einer höheren Zeit- und Amplitudenauflösung. Das Öffnungs- und Schließungsverhalten der LLO-Poren zeigte bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,5 die gleichen Charakteristika wie sie bei einem physiologischen pH-Wert von 7,35 zu sehen waren (vergleiche hierzu Abb. 8).

### **3.11 Porenbildende Aktivität chromosomal codierter Listeriolysin O-Punktmutanten von *L. monocytogenes***

Untersuchungen zur hämolytischen Aktivität verschiedener chromosomal codierter LLO-Punktmutanten von *L. monocytogenes* hatten gezeigt, dass bestimmte Aminosäuren des LLO-Moleküls eine entscheidende Rolle bei dieser Pathogenitätseigenschaft des LLO spielen (Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Chakraborty, Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Giessen). Bei diesen chromosomal codierten LLO-Punktmutanten ist das Gen *hly*, welches für LLO codiert, mutiert. Da die Mutation auf chromosomaler Ebene stattfindet, verhalten sich diese Mutanten hinsichtlich Expression, posttranslationaler Prozessierung und Sekretion von LLO wie der wildtypische Stamm von *L. monocytogenes*. Dies wurde in Western Blot-Experimenten bestätigt (Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Chakraborty).

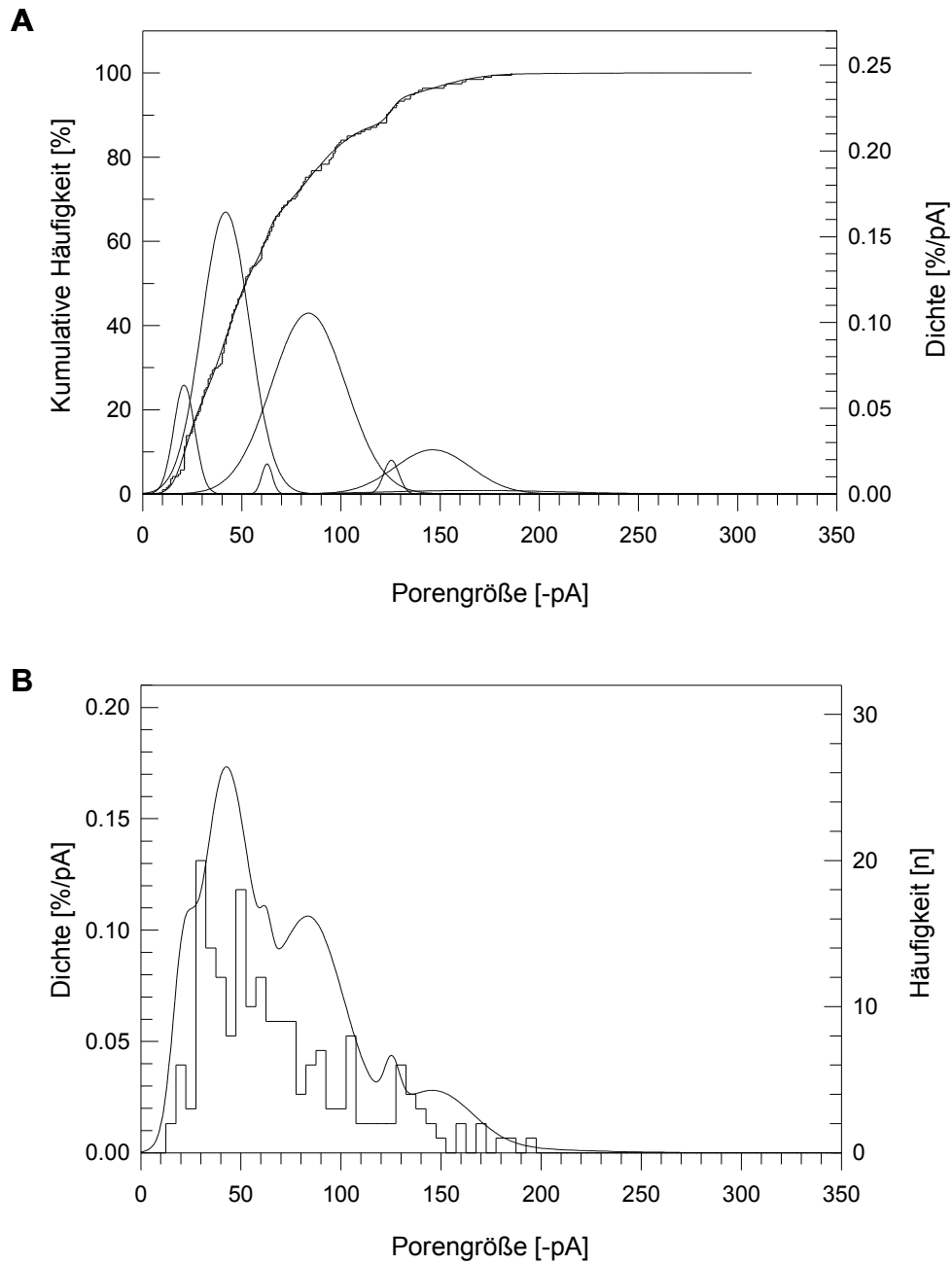
Mit den folgenden Experimenten sollte deshalb die Frage beantwortet werden, ob bzw. welche Bedeutung bestimmte Aminosäuren des LLO-Moleküls bei der Bildung von Poren in der Plasmamembran von HEK293-Zellen haben. Wir untersuchten die drei Punktmutanten *hly* H423A, *hly* C484S und *hly* W492A (siehe Abschnitt 1.3). Da diese LLO-Punktmutanten nicht in gereinigter Form vorlagen, wurden die Messungen ebenfalls mit standardisiert hergestellten Listeriensuspensionen durchgeführt (Abschnitt 2.2.1). Für die Messungen wurden jeweils 100 µl Listeriensuspension auf HEK293-Zellen appliziert. Abbildung 23 zeigt die Originalregistrierung einer Messung mit der Mutante *hly* H423A.



**Abb. 23:** Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension der Mutante *L. monocytogenes hly* H423A ( $= 50 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung). Ca. 200 s nach Applikation kommt es zur Bildung der ersten LLO-Pore. Bis zur Bildung der zehnten Pore vergehen weitere 130 s. Durch die stetig fortschreitende Porenbildung erreichen die Membranströme ca. 300 s nach der ersten Porenbildung eine Amplitude von ca. -1,0 nA. Das Haltepotenzial lag bei -40 mV.

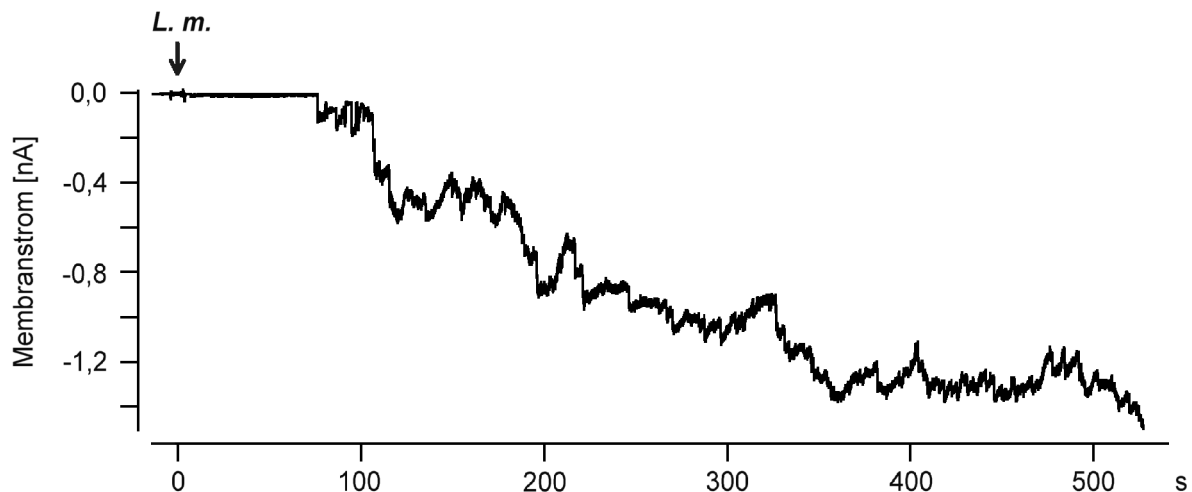
Hier fällt die lange Zeitspanne ab Applikation bis zur Bildung der ersten Pore auf. Während beim Wildtyp nur  $73 \pm 13$  s ( $n = 14$ ) vergingen, erfolgte die erste Porenbildung bei dieser Mutante mit  $209 \pm 44$  s ( $n = 5$ ) signifikant langsamer ( $p = 0,0007$ ). Die Zeitspanne ab Bildung der ersten Pore bis zur zehnten Pore erfolgte mit  $207 \pm 49$  s ( $n = 5$ ) ebenfalls signifikant langsamer ( $p = 0,0019$ ). Das Öffnungs- und Schließungsverhalten der LLO-Poren entspricht der Kinetik, die auch beim Wildtyp beobachtet werden konnte.

Die Messung der Amplituden der Porenströme wurde analog der Vorgehensweise in Abschnitt 3.2.2 durchgeführt. Die statistische Auswertung der Porenströme und die Erstellung der Amplitudenhistogramme wurden mit Hilfe von Gauss'schen Normalverteilungen durchgeführt (Details siehe Abschnitt 3.2.2). In Abbildung 24A ist die Häufigkeitsverteilung der Porengrößen nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension der Mutante *hly* H423A dargestellt. Abb. 11B zeigt das Amplitudenhistogramm der gemessenen Porengrößen in Kombination mit der berechneten Häufigkeitsverteilung. Die Amplituden der elementaren Porenströme zeigten bei einem Haltepotenzial von -40 mV eine Häufung bei etwa -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -120 pA und -140 pA. Dies entspricht Leitfähigkeiten von ca. 500 pS, 1000 pS, 1500 pS, 2000 pS, 3000 pS und 3500 pS.



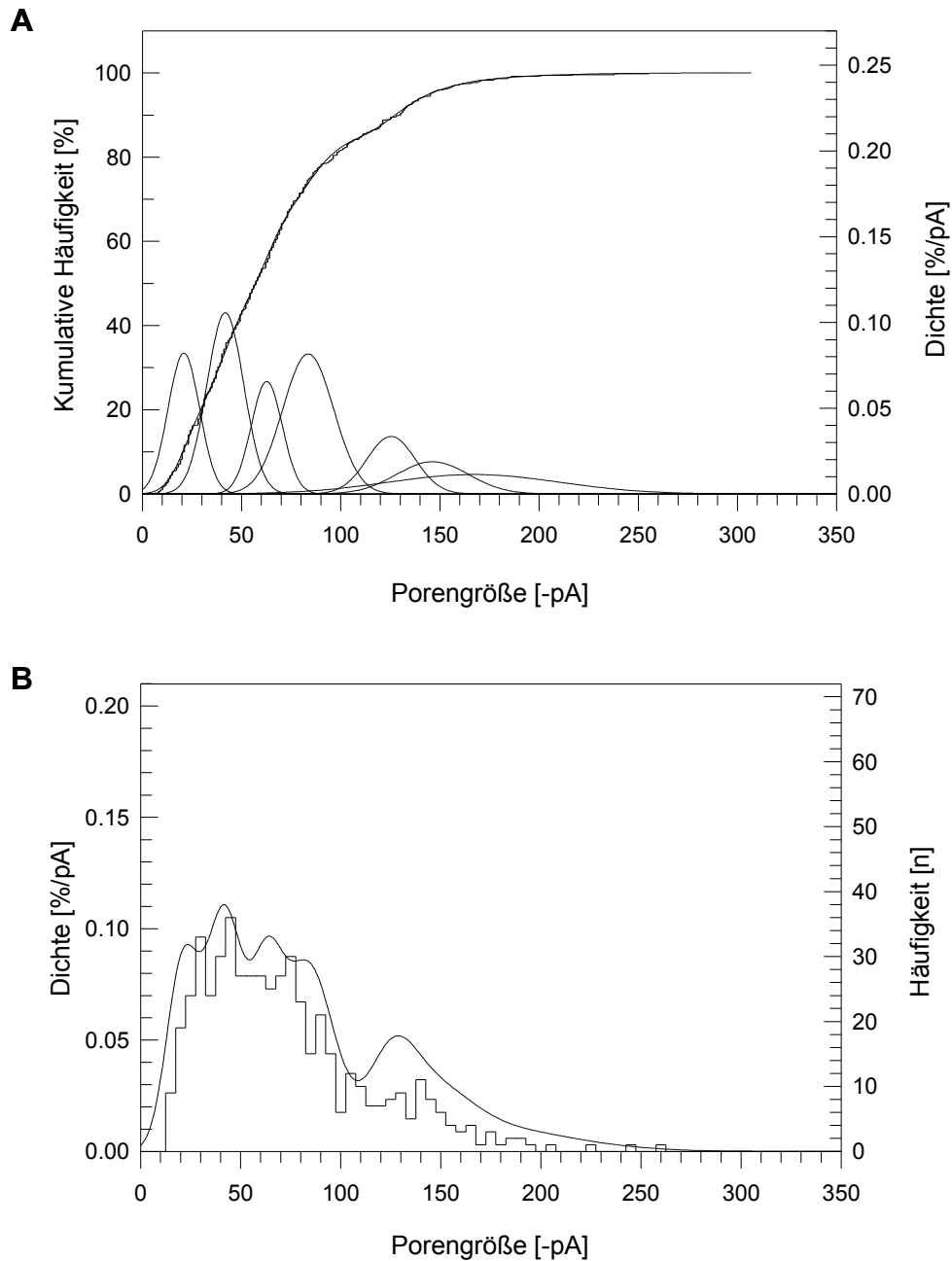
**Abb. 24:** **(A)** Häufigkeitsverteilung aller gemessenen Porenströme nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension der Mutante *hly* H423A an HEK293-Zellen bei einem Haltepotenzial von -40 mV. Aus der kumulativen Häufigkeit wurden die dargestellten einzelnen Häufigkeitsgipfel mit Hilfe von Gauss'schen Normalverteilungen ermittelt (Abschnitt 3.2.2). Es zeigt sich eine Häufung der Porenströme bei ca. -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -120 pA und -140 pA. **(B)** Das Histogramm zeigt die jeweilige Anzahl der gemessenen Porenströme bei einer Bandbreite von 5 pA. Die durchgezogene Linie repräsentiert die umhüllende Kurve der einzelnen Häufigkeitsgipfel, die in (A) dargestellt sind.

In Abbildung 25 sind die Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von *L. monocytogenes hly C484S* dargestellt. Der Zeitraum ab Applikation bis zur ersten Porenbildung betrug  $88 \pm 14$  s ( $n = 14$ ), ab Bildung der ersten Pore bis zur zehnten Pore vergingen  $117 \pm 21$  s ( $n = 13$ ). Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den Messergebnissen mit dem Wildtyp von *L. monocytogenes*. Die Kinetik der Porenöffnungen und -schließungen entsprach ebenfalls der des Wildtyps.



**Abb. 25:** Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension der Mutante *L. monocytogenes hly C484S* ( $= 50 \times 10^6$  Listerien/ml Badlösung). Ca. 80 s nach Applikation kommt es zur Bildung der ersten Pore, bis zur Bildung der zehnten Pore vergehen weitere 100 s. Ca. 450 s nach Bildung der ersten Pore haben die Membranströme einen Wert von ca. -1,4 nA erreicht. Das Haltepotenzial lag bei -40 mV.

Die statistische Auswertung der Porenströme zeigte bei einem Haltepotenzial von -40 mV eine Häufung bei etwa -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -120 pA, -140 pA und -160 pA (Abb. 26), was elementaren Leitfähigkeiten von 500 pS, 1000 pS, 1500 pS, 2000 pS, 3000 pS, 3500 pS und 4000 pS entspricht.



**Abb. 26:** **(A)** Häufigkeitsverteilung aller gemessenen Porenströme nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension der Mutante *hly* C484S an HEK293-Zellen bei einem Haltepotenzial von -40 mV. Aus der kumulativen Häufigkeit wurden die dargestellten einzelnen Häufigkeitsgipfel mit Hilfe von Gauss'schen Normalverteilungen ermittelt. Es zeigt sich eine Häufung der Porenströme bei ca. -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -120 pA, -140 pA und im Bereich von -160 pA. **(B)** Das Histogramm zeigt die jeweilige Anzahl der gemessenen Porenströme bei einer Bandbreite von 5 pA. Die durchgezogene Linie repräsentiert die umhüllende Kurve der einzelnen Häufigkeitsgipfel, die in (A) dargestellt sind.

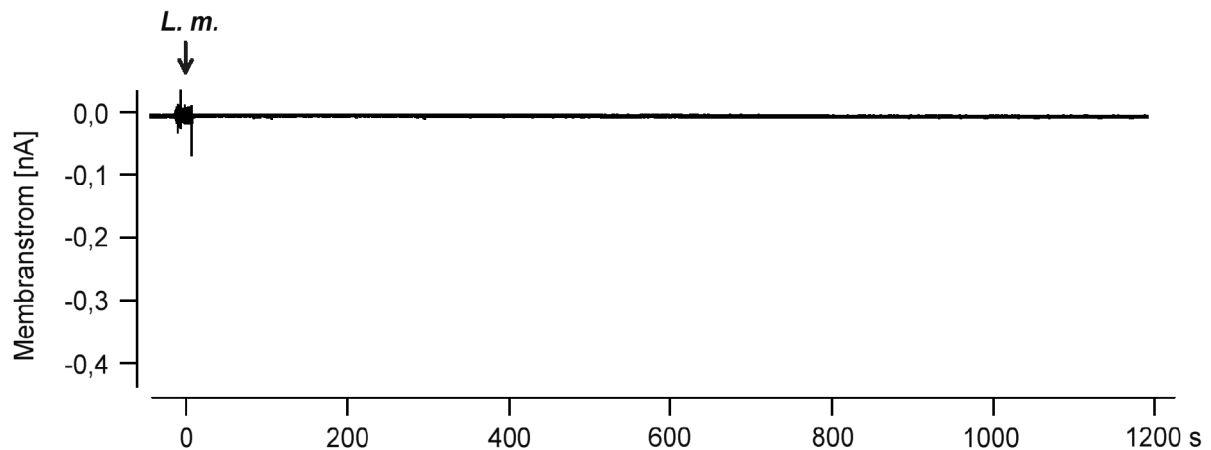


Die Punktmutation *hly* C484S hat also keinen Einfluss auf die Kinetik und die Geschwindigkeit der Porenbildung durch LLO, während die Punktmutation *hly* H423A die Porenbildung verlangsamt. Tabelle 4 zeigt die prozentuale Häufigkeitsverteilung der gefundenen Porengrößen für die beiden Punktmutanten *hly* H423A und *hly* C484S, wobei  $I_0$  der Grundpore mit einem elementaren Porenstrom von  $-20,9 \pm 4,1$  pA bei einem Haltepotenzial von -40 mV entspricht. Diese Daten und die grafischen Darstellungen in den Abbildungen 24 und 26 zeigen deutlich die Existenz einer Grundpore mit einer Größe von etwa -20 pA und deren ganzzahlige Vielfachen mit einem ähnlichen Verteilungsmuster analog unseren Messungen mit dem Wildtyp von *L. monocytogenes* (Abschnitt 3.2.2).

	$1 \times I_0$	$2 \times I_0$	$3 \times I_0$	$4 \times I_0$	$5 \times I_0$	$6 \times I_0$	$7 \times I_0$	$8 \times I_0$
<b><i>hly</i> H423A</b>	16,0	41,2	4,4	26,4	0,0	5,0	6,5	0,5
<b><i>hly</i> C484S</b>	20,6	26,5	16,5	20,5	0,0	8,4	4,7	2,8

**Tab. 4:** Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Grundpore ( $I_0 = -20,9 \pm 4,1$  pA bei einem Haltepotenzial von -40 mV) und ihrer ganzzahligen Vielfachen nach Applikation von 100  $\mu$ l Listerien-suspension der Punktmutanten *hly* H423A und *hly* C484S. Es zeigt sich eine deutliche Häufung der Porenströme im Bereich von  $1 \times I_0$  bis  $4 \times I_0$ , während höhere Werte von  $5 \times I_0$  bis  $8 \times I_0$  eine geringere Häufigkeit aufweisen.

Einen dramatischen Einfluss auf die Fähigkeit zur Porenbildung hat die Punktmutation *hly* W492A. Abbildung 27 zeigt eine Originalregistrierung bei Applikation von 100  $\mu$ l dieser LLO-Mutante. Man sieht, dass sie nicht in der Lage ist, Poren in der Plasmamembran der HEK293-Zellen zu bilden ( $n = 11$ ).



**Abb. 27:** Membranströme einer HEK293-Zelle nach Applikation von 100  $\mu$ l Listeriensuspension der Mutante *hly* W492A. Die Registrierung zeigt einen 20-minütigen Ausschnitt aus einer 60 min dauernden Aufnahme. Während der gesamten Aufnahmezeit kam es zu keiner Porenbildung. Das Haltepotenzial betrug -40 mV.

Um zu prüfen, ob das von dieser Punktmutante produzierte LLO tatsächlich die Fähigkeit zur Porenbildung verloren hat oder ob es nur über eine geringere Potenz verfügt, die durch eine höhere Konzentration ausgeglichen werden könnte, wurden Messungen mit einer vierfach höheren Konzentration durchgeführt. Hier zeigte *L. monocytogenes hly* W492A bei vier Messungen zweimal keine Porenbildung, einmal kam es nach 5 min zur Bildung mehrerer Poren, einmal 22 min nach Applikation der Listeriensuspension zur Bildung einer einzigen Pore. Die Fähigkeit zur Porenbildung ist bei der Mutante *hly* W492A also nicht gänzlich verloren, jedoch drastisch herabgesetzt.

### **3.12 Einfluss einer Vorinkubation der HEK293-Zellen mit *L. monocytogenes* hly W492A auf die Porenbildung durch *L. monocytogenes* Wildtyp**

Experimente mit dem durch *Bacillus anthracis* produzierten Anthraxtoxin zeigten, dass der Einbau von Monomeren einer defizienten Mutante in ein Heptamer von Wildtyp-Monomeren dieses Toxin ineffektiv macht (Sellman et al. 2001). Bei LLO-Poren geht man davon aus, dass sich mehrere Monomere von LLO-Molekülen in der Oberfläche der Zellmembran der Zielzelle zusammenlagern müssen, um eine funktionstüchtige Pore zu bilden. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit deuten darauf hin, dass sich mindestens drei LLO-Moleküle zur Bildung einer funktionstüchtigen Pore zusammenlagern müssen (Repp et al. 2002). Für das zur gleichen Familie der thiolaktivierten, cholesterol-abhängigen Toxine zählende Perfringolysin (PFO) ist eine Anzahl von vier Monomeren pro Pore beschrieben (Jacobs 1998). Mit den folgenden Messungen sollte untersucht werden, ob es durch eine Kombination von Monomeren der LLO-Moleküle des Wildtyps (WT) von *L. monocytogenes* und der nicht porenbildenden Mutante *L. monocytogenes* hly W492A zu einer Veränderung in der Porenbildung kommt.

Es wurden verschiedene Messreihen unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt. In der ersten Messreihe wurden 50 µl der Listerien-suspension vom WT und 50 µl der Mutante direkt vor Applikation in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengemischt und auf die HEK293-Zellen appliziert. Es kam zur Porenbildung. Die erste Pore trat  $119 \pm 31$  s ( $n = 3$ ) nach Applikation auf, die Zeitspanne erste bis zehnte Pore betrug  $176 \pm 42$  s ( $n = 3$ ). Als Vergleichsgruppe bzgl. der Charakteristika der Porenöffnungen und -schließungen sowie des Zeitverlaufs der Porenbildung dienten die Ergebnisse, die nach Applikation von 50 µl *L. monocytogenes* WT gewonnen worden waren (Abschnitt 3.3). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede.

In der zweiten Messreihe wurden die HEK293-Zellen nach Erstellen der Whole-Cell-Konfiguration für 7 min mit 100 µl der Bakteriensuspension der nicht porenbildenden Mutante inkubiert und dann wurden 50 µl *L. monocytogenes* WT appliziert. Nach Applikation dauerte es  $54 \pm 8$  s ( $n = 3$ ) bis zur Bildung der ersten Pore, die Zeitspanne erste bis zehnte Pore betrug  $118 \pm 44$  s ( $n = 3$ ). Wiederum trat damit kein

signifikanter Unterschied zur Vergleichsgruppe auf. Daraufhin wurde die Menge der applizierten Mutantensuspension auf 150 µl heraufgesetzt und die Inkubationszeit auf 20 min verlängert. Jedoch traten auch hier nach Applikation von 50 µl des Wildtyps Poren auf. Unter diesen Messbedingungen kam es  $27 \pm 4$  s ( $n = 3$ ) nach Applikation zur Bildung der ersten Pore, die Zeitspanne erste bis zehnte Pore betrug  $46 \pm 4$  s ( $n = 3$ ). Damit erfolgte die Porenbildung signifikant schneller als in der Kontrollgruppe.

Es galt nun auszuschließen, dass diese signifikant schnellere Porenbildung alleine darauf zurückzuführen war, dass sich die gemessene HEK293-Zelle bei Applikation des Wildtyps schon 20 min in der Whole-Cell-Konfiguration befunden hatte. Daher wurden Kontrollmessungen durchgeführt, bei denen HEK293-Zellen für 20 min in der Whole-Cell-Konfiguration gehalten wurden, bevor 50 µl *L. monocytogenes* WT appliziert wurden. Es kam  $97 \pm 31$  s ( $n = 4$ ) nach Applikation zur ersten Porenbildung, die Zeitspanne erste bis zehnte Pore betrug  $135 \pm 42$  s ( $n = 4$ ). Es zeigte sich somit kein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen, bei denen dieselbe Konzentration an Listerien sofort nach Erstellung der Whole-Cell-Konfiguration appliziert wurde (siehe Abschnitt 3.3). Die Vorinkubation der HEK293-Zellen mit dem mutierten, nicht porenbildenden LLO induziert also offenbar eine schnellere Porenbildung und erhöht somit die Potenz des wildtypischen LLOs.

## 4 Diskussion

Listeriolysin O (LLO) ist ein bedeutender Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes* (Portnoy et al. 1988; Cossart et al. 1989). Schon seit mehr als 30 Jahren wird dieses Bakterientoxin zur Gruppe der cholesterolbindenden, thiolaktivierten Hämolyse gerechnet (Portnoy et al. 1992; Alouf 2001). Die Zuschreibung einer porenbildenden Eigenschaft beruhte jedoch allein auf Schlussfolgerungen, die aus Experimenten zur hämolytischen Aktivität von LLO gezogen wurden. Der direkte, elektrophysiologische Nachweis der durch LLO induzierten Poren in der Plasmamembran von Zielzellen gelang erst unserer Arbeitsgruppe (Repp et al. 2002). Daher konnte gezeigt werden, dass drei verschiedene Porengrößen existieren mit einer elementaren Leitfähigkeit der Grundpore von 1150 pS und zwei größeren Poren mit ganzzahligen Vielfachen dieser Leitfähigkeit von 2100 pS und 3000 pS. Weiterhin konnte LLO eindeutig als der für die porenbildende Wirkung verantwortliche Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes* identifiziert werden. Der mutierte Listerienstamm  $\Delta hly$ , der aufgrund der Deletion des für LLO kodierenden Gens *hly* kein LLO produzieren kann (Guzman et al. 1995), war nicht fähig, Poren in der Plasmamembran der Zielzelle zu bilden (Repp et al. 2002).

Da von dem gereinigten LLO nur geringe Mengen und Chargen mit jeweils verschiedener biologischer Aktivität zur Verfügung standen, wurden die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen mit einer Suspension aus nativen Listerien durchgeführt (Abschnitt 2.2.1). Sowohl Messungen mit der Listeriensuspension als auch mit dem bakterienfreien Überstand dieser Suspension (Abschnitt 3.4) zeigten dieselben porenbildenden Effekte, wie sie mit dem gereinigten Toxin erzielt werden konnten (Abschnitt 3.2.1).

Die LLO-Poren weisen in ihrem Öffnungs- und Schließungsverhalten besondere Charakteristika auf, die in dieser Arbeit erstmals untersucht wurden. Während die Porenöffnungen immer sprunghaft ablaufen, sind die Porenschließungen durch zwei verschiedene Kinetiken charakterisiert. In ca. 30% der Fälle kommt es zu einer sprunghaften Abnahme des Porenstroms, vergleichbar mit den Öffnungen und Schließungen von Ionenkanälen. Dies deutet auf einen Aktivierungs- und Inaktivierungsprozess der LLO-Poren hin. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass die Dissoziation von einem oder mehreren LLO-Molekülen aus dem oligomeren

Porenpartikel zu einer sprunghaften Porenstromabnahme führt. In ca. 70% der Fälle wird die Porenstromabnahme durch einen langsamen, nahezu exponentiellen Verlauf charakterisiert, einer "Relaxation". Hier liegt die Vermutung nahe, dass diese Porenstromabnahmen durch Endozytose der durch LLO-Moleküle gebildeten Poren entstehen. Wäre dies der Fall, könnte eine Abhängigkeit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  bestehen, das - wie gezeigt - durch die Pore in den Intrazellulärraum fließen kann. Der Austausch von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $\text{Ba}^{2+}$  führte in der Tat zu einer Verschiebung der Porenschlüsse zugunsten der sprunghaften Porenstromabnahmen. Diese traten nun in ca. 60% der Fälle - gegenüber vorher 30% - auf, die „Relaxation“ war nur noch in ca. 40% der Fälle - im Vergleich zu vorher 70% - zu beobachten. Dies deutet auf einen zumindest teilweisen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Mechanismus der langsamen Porenstromabnahmen hin. Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt allerdings ungeklärt, welche dieser möglichen Mechanismen das Öffnen und Schließen der LLO-Pore bestimmen.

Die Wirksamkeit und die Fähigkeit der Listeriensuspension zur Porenbildung wurde anhand einer Konzentrations-Wirkungskurve untersucht. Diese zeigte eine sehr steile Abhängigkeit mit einem Maximaleffekt, der innerhalb einer Zehnerpotenz erreicht wurde (Abb. 14). Dies entspricht einem Hill-Koeffizienten von  $n > 2$  und weist darauf hin, dass sich mindestens drei LLO-Moleküle zusammenlagern müssen, um eine funktionsfähige Pore zu bilden. Diese Zahl ist in guter Übereinstimmung mit dem zur gleichen Familie der porenbildenden, cholesterolabhängigen Toxine zählenden Perfringolysin. Für Perfringolysin ist eine Anzahl von vier Monomeren pro Pore beschrieben (Jacobs et al. 1998). In der Literatur wird jedoch auch die Annahme vertreten, dass sich die Poren der cholesterolbindenden Toxine aus 40 bis 80 Monomeren zusammensetzen könnten (Billington et al. 2000). Dies wurde aus Experimenten geschlossen, in denen durch die Applikation hoher Konzentrationen an LLO, Streptolysin und Perfringolysin elektronenmikroskopisch Membranpartikel mit einem Durchmesser von 20 bis 30 nm dargestellt werden konnten (Jacobs et al. 1999). Dass diese elektronenmikroskopisch sichtbaren "Poren" identisch sind mit den elektrophysiologisch funktionell gemessenen Poren, ist jedoch zum einen aus energetischen Gründen unwahrscheinlich, zum anderen müsste dies zu einem extrem steilen, d.h. sprunghaften Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve führen.

Die Amplituden der elementaren Porenströme zeigten bei einem Haltepotenzial von -40 mV eine Häufung bei etwa -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -100 pA, -120 pA,

-140 pA und -160 pA. Dies entspricht Leitfähigkeiten von 500 pS, 1000 pS, 1500 pS, 2000 pS, 2500 pS, 3000 pS, 3500 pS und 4000 pS. Somit stellen sich eine Grundpore mit einer Größe von ca. -20 pA bzw. 500 pS und deren ganzzahlige Vielfache dar. Die Existenz einer so kleinen Grundpore konnte mit unseren Messungen zum ersten Mal gezeigt werden. Bisher sind wir davon ausgegangen, dass die kleinste durch LLO gebildete Pore eine Größe von ca. -45 pA bei einem Haltepotenzial von -40 mV aufweist (Repp et al. 2002), also gut doppelt so groß ist. Dieses Ergebnis wurde anhand von früheren Untersuchungen mit höher konzentrierten Listeriensuspensionen gewonnen. Mit dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass es bei Verwendung höherer Konzentrationen der Listeriensuspension zu einer Zunahme der Häufigkeit größerer Poren bei gleichzeitiger Abnahme der Grundpore kommt. Die nun von uns identifizierte Grundpore konnte besonders eindeutig bei Verwendung einer sehr geringen LLO-Konzentration identifiziert werden und ist offensichtlich die kleinste der von LLO-Molekülen gebildeten „Poreneinheiten“. Das Vorhandensein einer Grundpore und ihrer ganzzahligen Vielfachen könnte damit erklärt werden, dass die einzelnen LLO-Poren geclustert in der Zellmembran ihrer Zielzelle vorliegen. Da LLO-Moleküle an das Cholesterol der Zellmembran der Zielzelle inserieren, ist eine Ansammlung von LLO-Poren ("geclusterte Poren") in cholesterolreichen Regionen der Zellmembran wahrscheinlich. Die gemessenen Vielfachen der Leitfähigkeit der Grundpore könnten dann durch ein synchrones Öffnen und Schließen dieser geclusterten Membranporen erklärt werden. Ein synchrones Öffnen und Schließen von geclusterten Ionenkanälen ist bereits für Cl-Kanäle (Larsen et al. 1996), Syringomycin E-Ionenkanäle von *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (Kaulin et al. 1998) und Ca<sup>2+</sup>-permeable, nichtselektive Polycystin-2-Kationenkanäle (Gonzalez-Perret et al. 2001) beschrieben worden. Damit würde sich nicht die Leitfähigkeit der einzelnen Pore erhöhen bzw. verändern, sondern jeweils die Gesamtleitfähigkeit der im Cluster zusammengelagerten Grundporen. Die bei der Verwendung höherer Konzentrationen gezeigte Abnahme der Häufigkeit der Grundpore bei gleichzeitiger Zunahme der Poren mit einer vielfachen Leitfähigkeit der Grundpore wäre durch größere Porencluster zu erklären, die sich bei höheren LLO-Konzentrationen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit bilden als bei niedrigen LLO-Konzentrationen. Wie in Abbildung 8 dargestellt, sind bei den Porenschließungen auch unvollständige Porenschlüsse ("sublevels") zu beobachten. Diese "sublevels" könnten durch ein

zeitlich versetztes Öffnen und Schließen der einzelnen Grundporen eines Porenpoools erklärt werden. Eine Gesamtleitfähigkeit von einer gemessenen Pore von 1500 pS wäre durch ein synchrones Öffnen von drei Grundporen zu erklären, beim Porenschluss registrierte "sublevels" durch deren zeitlich versetztes Schließen. Diese Hypothese einer Clusterung bietet auch eine Erklärung für die bereits erwähnten Ergebnisse aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei denen sehr hohe Toxinkonzentrationen (im Milligramm pro Milliliter-Bereich; Jacobs et al. 1999) benutzt wurden und die die LLO-Pore als 20 bis 30 nm große Partikel in Zellmembranen beschreiben, die sich aus 40 bis 80 Monomeren zusammensetzen sollen. Unter der Annahme, dass eine LLO-Grundpore aus drei Monomeren besteht, würde das bedeuten, dass die bei sehr hoher Konzentration elektronenmikroskopisch sichtbare "Pore" einem Cluster von etwa 15 bis 30 Grundporen entsprechen würde.

Beauregard et al. (1997) konnten zeigen, dass die Lyse intrazellulärer Lysosomen durch LLO ein pH-abhängiger Prozess ist und dass ein niedriger pH-Wert die Aktivität von LLO steigert. Eine Verschiebung des pH-Wertes von 7,35 auf 6,5 führte jedoch zu keinen Veränderungen in der LLO-Porenbildung. Somit konnte der für die lytische Wirkung des LLO nachgewiesene positive Effekt eines sauren pH-Wertes für die elektrophysiologisch nachgewiesene porenbildende Wirkung nicht gezeigt werden.

LLO-Poren sind unselektiv permeabel für monovalente Kationen wie  $K^+$  und  $Na^+$  und divalente Kationen wie  $Ca^{2+}$  und  $Ba^{2+}$  und durchgängig für größere Moleküle wie Tetraethylammonium (TEA). Die Permeabilität für  $K^+$ ,  $Na^+$  und TEA konnte durch Messungen gezeigt werden, in denen das Umkehrpotenzial der LLO-Pore anhand von Strom-Spannungskurven sowohl mit physiologischen als auch modifizierten Ionenlösungen gemessen wurde. In Messungen mit TEA-Chlorid anstelle von NaCl in der Extrazellulärlösung kam es zu Verschiebungen des Umkehrpotenzials um ca. -8 mV, was darauf hinweist, dass die LLO-Poren bereits eine verminderte Permeabilität für Moleküle mit einem Ionendurchmesser von 0,72 nm haben im Vergleich zu  $Na^+$  und  $K^+$ . Dieses Ergebnis steht ebenfalls im Widerspruch zur Annahme eines Porendurchmessers von 20 bis 30 nm aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen, ist jedoch mit dem von uns vorgestellten Modell geclusterter Grundporen erklärbar. Der elektronenmikroskopisch gefundene Wert für den Durchmesser der oligomeren LLO-Partikel von 20 bis 30 nm darf somit nicht mit



dem innerhalb der Lipid-Doppelschicht liegenden Porendurchmesser gleichgesetzt werden. Die bis vor kurzem noch diskutierte Frage, ob es sich bei der LLO-Pore wirklich um eine transmembrane Pore handelt oder ob es durch die Insertion von Oligomeren in die Zellmembran zu einer Destabilisierung der Lipid-Doppelschicht kommt, die zur Bildung von nichtlamellären Strukturen und damit einem Zusammenbruch der Permeabilitätsschranke führt (Billington et al. 2000), konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig beantwortet werden. Ein solcher Prozess würde nicht zu den in den Amplitudenhistogrammen der Porenströme eindeutig zu klassifizierenden Grundporen und deren ganzzahligen Vielfachen führen, wie sie in dieser Arbeit nachgewiesen wurden.

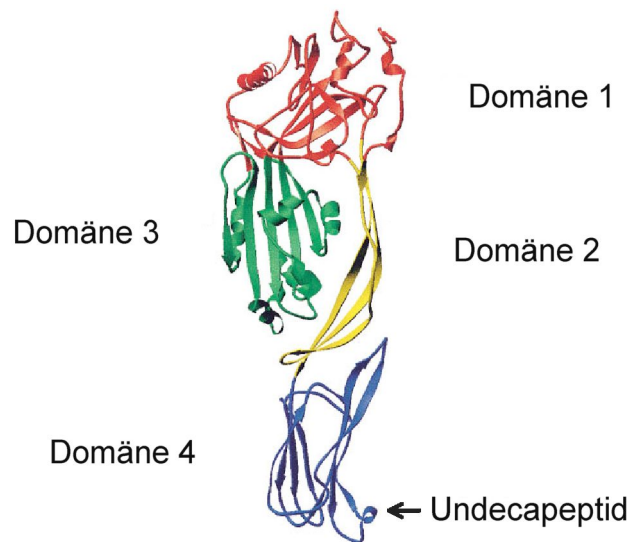
Wadsworth und Goldfine (1999) zeigten, dass es nach Applikation einer Listeriensuspension zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in J774-Zellen kommt. Diese Erhöhung der intrazellulären, freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration trat 1 min, 5 min und 15 min nach Applikation auf, jeweils mit Rückgang auf den Ausgangswert. Alle drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhungen konnten nach Inkubation der J774-Zellen mit dem Blocker für rezeptorgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle SK&F 96365 (Rink 1990) nicht mehr registriert werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigen eindeutig, dass es nach Blockade endogener  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einer Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle durch LLO in HEK293hSK4-Zellen kommt. Dass dabei das intrazellulär im ER gespeicherte  $\text{Ca}^{2+}$  nicht essentiell ist, wird durch Messungen gezeigt, in denen mit einem weitgehend  $\text{Ca}^{2+}$ -freien intrazellulären Milieu gearbeitet wurde (siehe Abschnitt 3.8). Kontrolliert wurde dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -freie intrazelluläre Milieu durch Applikation der mitogenen Substanz Lysophosphatidsäure (LPA) (Abschnitt 2.5). Aus früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass LPA an HEK293hSK4-Zellen zu einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung mit konsekutiver Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Ströme führt (Decker 1999). Messungen an NIH3T3-Mäusefibroblasten, die den entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanal endogen exprimieren und eine ähnliche Aktivierungskaskade aufweisen, zeigten nach LPA-Applikation - trotz einer nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Extrazellulärlösung - noch eine 25%ige Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Ströme (Repp et al. 1998). Dies ließ vermuten, dass auch intrazellulär gespeichertes  $\text{Ca}^{2+}$  durch eine LPA-aktivierte Signalkaskade aus dem ER freigesetzt werden könnte. Unter unseren Messbedingungen kam es nach LPA-Applikation zu keiner Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle, was den Schluss zulässt, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration so stark abgesunken war, dass sie unterhalb der zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle notwendigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsschwelle blieb. Die oszillatorische Aktivierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms kann bei unseren gewählten Versuchsbedingungen also nur durch den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch membranständige LLO-Poren erklärt werden. In Versuchen, bei denen extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $\text{Ba}^{2+}$  ersetzt wurde, kam es in HEK293hSK4-Zellen zwar noch zur Porenbildung, jedoch nicht mehr zur Aktivierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms. Oszillationen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, verursacht durch LLO, konnten direkt durch Messungen mit dem fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Indo 1-AM gezeigt werden. Durch Verwendung sublytischer LLO-Konzentrationen ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ) konnten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen kontinuierlich während einer Aufnahmezeit von einer Stunde registriert werden. Die Oszillationen traten in allen Zellen auf und waren abhängig von der Anwesenheit extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Es konnten zwei unterschiedliche Formen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen beobachtet werden: kurzfristige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsspitzen mit einem schnellen Rückgang auf den Ausgangswert und langsame  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen mit einer eher wellenförmigen Zu- und Abnahme. Diese beiden Formen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsverläufe sind in ihrer Kinetik vergleichbar mit den Porenstromänderungen, die elektrophysiologisch gemessen wurden: schneller Anstieg der Membranströme durch gleichzeitiges Öffnen bzw. langsamer Anstieg durch ein zeitlich versetztes Öffnen mehrerer Poren mit folgendem sprunghaften oder auch langsamen Rückgang und/oder erneuter sprunghafter Zunahme. Unsere Experimente identifizieren intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen als eine funktionelle Konsequenz der Bildung und Schließung von LLO-Poren.

In den letzten Jahren sind mehrere Publikationen erschienen, die zeigen, dass sublytische Konzentrationen von LLO eine Vielzahl zellulärer Interaktionen und intrazellulärer Signalübertragungen beeinflussen können, wie z.B. die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (Tang et al. 1996), die Induktion der Produktion von Signalmolekülen wie Inositoltriphosphat und Diacylglycerol (Sibeliu et al. 1996), die Modulation der Genexpression verschiedener Zytokine (Nishibori et al. 1996), die Expression von Adhäsionsmolekülen auf infizierten Endothelzellen (Krull et al. 1997), die Einschleusung heterologer Antigene für die MHC-Klasse-I-abhängige intrazelluläre Antigenprozessierung und Oberflächenpräsentation (Darji et al. 1995b), die Induktion der Zellapoptose (Guzman et al. 1996), die Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B) (Kayal et al. 1999) und die Induktion der Schleimsekretion an Darmepithelzellen (Coconnier et al. 1998). Diese Effekte sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und können durch eine Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst werden (Berridge et al. 1998). Dies könnte darauf hindeuten, dass die durch LLO-Poren ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen eine gemeinsame molekulare Basis dieser Signaleffekte darstellen. *L. monocytogenes* benutzt offensichtlich das sezernierte LLO als eine Art Fernsteuerung, um - ohne direkte Interaktion des Bakteriums mit der Zelle - die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zielzellen zu beeinflussen. Die Entdeckung, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zielzelle durch die LLO-Poren selbst beeinflusst werden kann, ist eine neue Erkenntnis über die Eigenschaften der bakteriellen Toxine und konnte von unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal gezeigt werden.

Zur Gruppe der porenbildenden, cholesterolbindenden Toxine gehören neben LLO noch 22 weitere Toxine grampositiver, pathogener Bakterien wie u.a. Streptolysin, Perfringolysin, Pneumolysin und Alveolysin. Die Toxine dieser Gruppe weisen eine große Übereinstimmung von etwa 40 bis 70% in ihrer Aminosäuresequenz auf (Alouf 2000; Tweten et al. 2001). An Position 483 bis 493 enthält LLO ein sogenanntes "Undecapeptid" mit der Aminosäuresequenz ECTGLAWEWWR, welches für die cholesterolbindende und porenbildende, also lysierende Wirkung dieses Proteins verantwortlich ist. Dieses Undecapeptid am C-terminalen Ende ist ein gemeinsames Merkmal aller thiolaktivierten, cholesterolbindenden Toxine. Bisher existiert nur für Perfringolysin eine 3D-Struktur aus kristallografischen Untersuchungen (Abb. 28). Da man annimmt, dass alle thiolaktivierten, cholesterolbindenden Toxine eine ähnliche 3D-Struktur aufweisen (Billington et al. 2000), kann mit diesen Daten für Perfringolysin auch eine Vorstellung für die Struktur des LLO-Moleküls entwickelt werden.



**Abb. 28:** Dreidimensionale Struktur eines thiolaktivierten, cholesterolbindenden Toxins. Repräsentative Struktur des Perfringolysin-Moleküls. Die verschiedenen Domänen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet, Domäne 4 enthält das Undecapeptid (Rossjohn et al. 1997).

Nach dieser Vorstellung müsste LLO aus vier Domänen mit einer verlängerten, keilähnlichen Form, die reich an Beta-Faltblattstrukturen ist, bestehen. Während die Domänen 1 bis 3 an der Oligomerisation beteiligt sind, ist Domäne 4 für die Insertion der Toxinmonomere in die Membran der Zielzelle verantwortlich. Das hydrophobe Undecapeptid an Position 483 bis 493 am C-terminalen Ende, welches offenbar für die porenbildende Wirkung von größter Bedeutung ist, liegt am äußersten Ende der Domäne 4 (Jacobs et al. 1999). Es wird postuliert, dass es durch die Bindung der Toxinmonomere an membranständiges Cholesterol zu einer Ansammlung von Toxinmonomeren in bestimmten, cholesterolreichen Regionen der Lipid-Doppelschicht kommt, was dann die Oligomerisation der Moleküle fördert. Dabei führt die Bindung von Domäne 4 an Cholesterol zu einer Konformationsänderung des Moleküls in einen hydrophoberen Zustand mit nachfolgender Förderung von Insertion und Oligomerisation. Experimente mit cholesterolinaktiviertem LLO zeigten, dass dieses LLO zwar noch an die Zellmembran binden konnte, jedoch nicht mehr fähig war zur tiefen Insertion und damit zur Oligomerisation und Porenbildung (Jacobs et al. 1999).

In dieser Arbeit konnte erstmals elektrophysiologisch nachgewiesen werden, dass bestimmte Aminosäuren des LLO-Moleküls von entscheidender Bedeutung für die porenbildende Wirkung von *L. monocytogenes* sind. Für unsere Messungen standen

drei *L. monocytogenes*-Stämme, die jeweils eine LLO-Punktmutante exprimieren, zur Verfügung: *hly* H423A, *hly* C484S und *hly* W492A. Bei *L. monocytogenes hly* W492A wurde an Position 492 des LLO, also innerhalb des Undecapeptids, die Aminosäure Tryptophan durch Alanin ersetzt. *hly* W492A zeigte keine porenbildende Aktivität bei der standardmäßig benutzten Toxinkonzentration. Nach Applikation einer sehr viel höheren Konzentration dieser Punktmutante auf die HEK293-Zellen kam es bei zwei von vier Messungen zu einer sehr stark verzögerten Bildung einzelner Poren. Die Fähigkeit von *L. monocytogenes hly* W492A zur Porenbildung ist demnach nicht gänzlich verloren gegangen, jedoch extrem reduziert. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit Messungen an Erythrozytenmembranen, die ebenfalls einen dramatischen Verlust der hämolytischen Aktivität der Punktmutante *hly* W492A auf unter 0,01% zeigten (Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Chakraborty, Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Giessen). Der Austausch der hydrophoben Aminosäure Tryptophan entweder an Position 489, 491 oder 492 im Undecapeptid sowohl des LLOs, als auch des Perfringolysins, Pneumolysins und des Pyolysins führt zu einer signifikanten Reduktion der hämolytischen Aktivität (Billington et al. 2000), die auf eine reduzierte Bindung an das membranständige Cholesterol der Zielzelle zurückzuführen ist (Sekino-Suzuki et al. 1996). Es wird postuliert, dass die bereits erwähnte Konformationsänderung von LLO nach Bindung an Cholesterol zur Exposition der hydrophoben Aminosäure Tryptophan auf der Oberfläche des Proteins führt, wodurch es zu einem Wechsel in den hydrophoberen Zustand kommt (Rossjohn et al. 1997). Dabei wird allen drei Tryptophanen in den Positionen 489, 491 und 492 des Undecapeptids eine entscheidende Rolle bei der Insertion und somit auch Oligomerisation zugesprochen. Unsere Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die stark hydrophobe Aminosäure Tryptophan an Position 492 im Undecapeptid des LLO eine essentielle Rolle bei der Bildung der LLO-Pore spielt.

Für die weitere in dieser Arbeit untersuchte Punktmutante im Bereich des Undecapeptids, *L. monocytogenes hly* C484S, konnte kein signifikanter Einfluss auf die Porenbildung gezeigt werden. Untersuchungen zur hämolytischen Aktivität dieser Mutante zeigten eine Reduzierung auf ca. 20% im Vergleich zum wildtypischen LLO. Andere Studien, in denen Cystein durch Alanin ersetzt wurde, zeigten keine Veränderung in der hämolytischen Aktivität (Jacobs et al. 1999). Die im Undecapeptid liegende Aminosäure Cystein ist verantwortlich für die Sensitivität des

Toxins zur Thiolaktivierung (Billington et al. 2000). So konnte im Streptolysin nach dem Austausch von Cystein durch Alanin eine fehlende Sensitivität des Toxins gegenüber Oxidation festgestellt werden (Pinkney et al. 1989). Während Cystein einen - wenn auch nur geringen - Beitrag zur hämolytischen Aktivität zu leisten scheint, zeigen unsere Messungen, dass es keinen Einfluss auf die porenbildende Aktivität des Toxins hat. Dies zeigt, dass nicht eine Mutation im Undecapeptid des LLO per se die Porenbildung durch *L. monocytogenes* beeinflusst, sondern dass offensichtlich nur bestimmte Aminosäuren essentiell sind.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die Aminosäure Histidin an Position 423 des LLO-Moleküls eine Rolle bei der Porenbildung spielt, obwohl sie nicht innerhalb des Undecapeptids liegt. Allerdings lässt ein Vergleich mit Perfringolysin aufgrund der ähnlichen 3D-Struktur die Schlussfolgerung zu, dass die Position 423 am Beginn der Domäne 4 des LLO-Moleküls liegt. Über Perfringolysin, welches aus 500 Aminosäuren besteht, ist bekannt, dass sich die Domäne 4 aus den Aminosäuren von Position 391 bis 500 zusammensetzt (Rossjohn et al. 1997). Der Austausch des Histidins durch Alanin an Position 423 des LLO-Moleküls führte zu einer signifikant langsameren Porenbildung. Ob dieser signifikante Unterschied durch ein Defizit in der Cholesterolbindungsfähigkeit oder der Fähigkeit zur Oligomerisation zustande kommt oder ob hier eine andere Fehlfunktion zugrunde liegt, muss durch weitere Experimente geklärt werden. Die Amplituden der elementaren Porenströme zeigten bei einem Haltepotenzial von -40 mV bei *L. monocytogenes hly* H423A und *hly* C484S eine Häufung bei -20 pA, -40 pA, -60 pA, -80 pA, -120 pA, -140 pA und -160 pA. Die von uns in Untersuchungen mit dem Wildtyp von *L. monocytogenes* identifizierte Grundpore mit einer Größe von etwa -20 pA und derer ganzzahligen Vielfachen zeigten sich bei Applikation der Punktmutanten somit auch. Dies lässt den Schluss zu, dass die Punktmutation in beiden Fällen keinen Einfluss auf die Porengröße hat.

Der Einbau von Monomeren einer defizienten Anthratoxin-Mutante von *Bacillus anthracis* in ein Heptamer von Wildtyp-Monomeren machte dieses Toxin ineffektiv (Sellman et al. 2001). Einen solchen interferierenden Effekt konnten wir in unseren Messungen für LLO nicht zeigen. Nach 20-minütiger Vorinkubation der HEK293-Zellen mit der nicht porenbildenden Mutante *L. monocytogenes hly* W492A kam es nach Applikation des Wildtyps sogar zu einer signifikant schnelleren Porenbildung als bei nicht vorinkubierten Zellen, d.h. die Anwesenheit der LLO-Mutante

*hly* W492A verbesserte offensichtlich sogar die Fähigkeit zur Porenbildung durch funktionsfähige LLO-Moleküle.

Eine kristallografische Strukturanalyse des von *L. monocytogenes* sezernierten Toxins LLO existiert bisher noch nicht. So können die dem LLO zugeschriebenen Struktureigenschaften bisher nur durch Analogieschlüsse gewonnen werden, die aus Untersuchungen mit Perfringolysin abgeleitet wurden. Der Einsatz der Elektrophysiologie bietet daher vielfältige Möglichkeiten, den Mechanismus der porenbildenden, cholesterolbindenden Toxine insbesondere bei Punktmutanten zu untersuchen und kann deshalb maßgeblich zur Aufklärung dieses Mechanismus beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Das von *L. monocytogenes* sezernierte Toxin LLO induziert eine elektro-physiologisch darstellbare Porenbildung in der Zellmembran von Zielzellen. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese LLO-Poren unselektiv permeabel für monovalente Kationen wie  $K^+$  und  $Na^+$  und divalente Kationen wie  $Ca^{2+}$  und  $Ba^{2+}$  sind. Sowohl die Geschwindigkeit der Porenbildung als auch die Häufigkeit des Auftretens verschiedener Porengrößen konnten als konzentrationsabhängige Prozesse identifiziert werden.

Erstmals konnte mit der vorliegenden Arbeit die Existenz einer LLO-Grundpore mit einer Leitfähigkeit von ca. 500 pS nachgewiesen werden. Diese Grundporen scheinen in Form von „Clustern“ in cholesterolreichen Regionen der Zellmembran der Zielzelle vorzuliegen und daher in unterschiedlicher Zahl zusammengeschaltet zu sein. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus dem beobachteten Auftreten höherer Porenleitfähigkeiten, die ganzzahlige Vielfache der Leitfähigkeit der Grundpore darstellen. Zudem spricht das Auftreten sog. „sublevels“ beim Öffnen und Schließen der Poren für diese Hypothese. Die LLO-Poren weisen in ihrem Öffnungs- und Schließungsverhalten unterschiedliche Charakteristika auf, die in dieser Arbeit erstmals untersucht wurden. Während Porenöffnungen immer sprunghaft ablaufen, sind Porenschließungen sowohl in einer sprunghaften als auch einer langsamen, eher exponentiell verlaufenden Form zu registrieren. Dieser langsame Porenschluss scheint zumindest teilweise ein  $Ca^{2+}$ -abhängiger Prozess zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die einzelne Grundpore einen Minstdurchmesser von ca. 0,7 nm aufweist und aus etwa drei Monomeren besteht. Die bisher in der Literatur beschriebenen, bei hohen Toxinkonzentrationen elektronenmikroskopisch sichtbaren „Poren“ würden somit einem Cluster von ca. 15 bis 30 Grundporen entsprechen.

Sublytische Konzentrationen von LLO können eine Vielzahl an zellulären Interaktionen und intrazellulären Signalübertragungen beeinflussen, die  $Ca^{2+}$ -abhängig sind und durch eine Änderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration beeinflusst werden. Wir konnten zeigen, dass es nach Applikation sowohl der Listerien-suspension als auch des gereinigten LLOs zu einem Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  durch membranständige LLO-Poren und damit zu Veränderungen der intra-



zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zielzelle kann somit ohne direkten Kontakt mit Listerien allein durch die LLO-Poren selbst beeinflusst werden.

Unsere Messungen mit chromosomalen Punktmutanten von *L. monocytogenes* belegen eindrucksvoll, dass bestimmte Aminosäuren des LLO-Moleküls von entscheidender Bedeutung für die porenbildende Wirkung von LLO sind. So führt eine Punktmutation im sog. Undecapeptid an Position 492 zu einem fast vollständigen Verlust der porenbildenden Aktivität. Das Undecapeptid stellt eine hochkonservierte Region innerhalb der Familie der cholesterolabhängigen Zytolysine dar. Die mit den LLO-Mutanten gefundenen elektrophysiologischen Ergebnisse können nun als Basis dienen, um zu klären, ob bzw. wie bestimmte Mutationen in der cholesterolbindenden Domäne und besonders im Undecapeptid anderer Toxine dieser Familie die porenbildende Aktivität beeinflussen.

## 6 Summary

Listeriolysin (LLO) of *L. monocytogenes* leads to the generation of pores in the plasma membrane of target cells which can be visualized by electrophysiological recording. Our experiments indicate that the LLO-formed pores are non-selective, at least for cations such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$ . Both, the extent of pore formation by LLO in the plasma membrane as well as the distribution of pore sizes are dependent on LLO-concentration.

For the first time the present work demonstrates the existence of a small LLO-formed pore with a conductance of approx. 500 pS. This finding strongly suggests that single LLO-pores form clusters in cholesterol-rich regions of the plasma membrane exhibiting synchronized opening and closing states, as the observed conductances of the larger pores are manifold multiples of that of the small pore. When recording the openings and closings of the pores we measured different sublevels, too, which also are in accordance with this hypothesis. The pore openings and closings show different characteristics. Whereas the pore openings always exhibited rapid kinetics, pore closings occurred either slowly or abruptly. The slowly closing seems to be - at least partly - a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent process. Our experiments show that at least three LLO molecules are required to create a functional pore with a minimum diameter of approx. 0.7 nm. The pores so far described in literature visualized by electron microscopy after application of high toxin concentrations thus probably correspond to a cluster of approx. 15 to 30 single pores.

Various signaling events and cellular effects are triggered by LLO through unknown mechanisms. All these different cellular responses are  $\text{Ca}^{2+}$  dependent and can be modulated by changes of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level. Here, we demonstrated that LLO applied extracellularly at sublytic concentrations causes long-lasting oscillations of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level resulting from a pulsed influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  through pores that are formed by LLO in the plasma membrane. Our data identify LLO as a tool used by *L. monocytogenes* to manipulate the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level without direct contact of the bacterium with the target cell.

Experiments with mutant strains of *L. monocytogenes* show impressively the importance of certain amino acids to the LLO molecule for the pore formation. The deletion of an amino acid at position 492 within the so-called “undecapeptide” leads

to an almost complete loss of activity. The undecapeptide is a highly conserved region present in all of the cholesterol dependent cytolysins. The electrophysiological results of our experiments with LLO mutants can now serve as a basis to clarify whether respectively how certain mutations within the cholesterol binding domain and especially within the undecapeptide of other cholesterol dependent cytolysins interfere with their ability to form pores.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abramowitz and Stegun (1979) Handbook of mathematical functions. National Bureau of Standards
- Alouf JE (2000) Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol* 290: 351 - 356
- Alouf JE (2001) Pore-forming bacterial protein toxins: an overview. *Curr Top Microbiol Immunol* 257: 1 - 14
- Barry PH and Lynch JW (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* 121: 101 - 117
- Beauregard KE, Lee KD, Collier RJ and Swanson JA (1997) pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 186: 1159 - 1163
- Berjukow S, Doring F, Froschmayr M, Grabner M, Glossmann H and Hering S (1996) Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Br J Pharmacol* 118: 748 - 754
- Berridge MJ, Bootman MD and Lipp P (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* 395: 645 - 648
- Billington SJ, Jost BH and Songer JG (2000) Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 182: 197 - 205
- Bootman MD, Lipp P and Berridge MJ (2001) The organisation and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *J Cell Sci* 114: 2213 - 2222
- Chakraborty T and Goebel W (1988) Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol* 138: 41 - 58
- Chakraborty T, Leimeister-Wächter M, Domann E, Hartl M, Goebel W, Nichterlein T and Notermans S (1992) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* 174: 568 - 574
- Chakraborty T, Wehland J (1997) The host cell infected with *Listeria monocytogenes*. In Kaufmann SHE (ed.), *Host response to intracellular pathogens*. R G Landes Company, Austin, Tx, 271 - 290
- Chakraborty T (1999) Molecular and cell biological aspects of infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* 201: 155 - 163
- Chakraborty T, Hain T and Domann E (2000) Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol* 290: 167 - 174
- Coconnier MH, Dlissi E, Robard M, Laboisie CL, Gaillard JL and Servin AL (1998) *Listeria monocytogenes* stimulates mucus exocytosis in cultured human polarized mucosecreting intestinal cells through action of listeriolysin O. *Infect Immun* 66: 3673 - 3681
- Conner SD and Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37 - 44

- Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC and Berche P (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 57: 3629 - 3636
- Cossart P and Lecuit M (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J* 17: 3797 - 3806
- Darbha S and Marchase RB (1996) Regulation of intracellular calcium is closely linked to glucose metabolism in J774 macrophages. *Cell Calcium* 20: 361 - 371
- Darji A, Chakraborty T, Niebuhr K, Tsonis N, Wehland J and Weiss S (1995b) Hyperexpression of listeriolysin in the nonpathogenic species *Listeria innocua* and high yield purification. *J Biotechnol* 43: 205 - 212
- Decker K (1999) Aktivierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, spannungsunabhängigen  $\text{K}^{+}$ -Kanals in Mäusefibroblasten durch die onkogene Rezeptortyrosinkinase des Katzensarkomvirus. Dissertation, Giessen
- Domann E, Leimeister-Wächter M, Goebel W and Chakraborty T (1991) Molecular cloning, sequencing and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect Immun* 59: 65 - 72
- Domann E (1992) Molekulargenetische Untersuchungen der Virulenzfaktoren Phospholipase (PlcA), Listeriolysin (LisA), Protease (Mpl) und Aktin-Bindung (ActA) und deren koordinierte Regulation durch den positiven Regulator PrfA von *Listeria monocytogenes*. Dissertation, Würzburg
- Farber JM and Peterkin PI (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55: 476 - 511
- Gaillard JL, Berche P and Sansonetti P (1986) Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 52: 50 - 55
- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE and Berche P (1987) Purification, characterization and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 55: 1641 - 1646
- Gonzalez-Perret S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaout MA and Cantiello HF (2001) Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1182 - 1187
- Guzman CA, Rohde M, Chakraborty T, Domann E, Hudel M, Wehland J. and Timmis KN (1995) Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect Immun* 63: 3665 - 3673
- Guzman CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T and Timmis KN (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 20: 119 - 126
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85 - 100

- Hille B (1967) The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J Gen Physiol* 50: 1287 - 1302
- Jacobs T, Darji A, Frahm N, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T and Weiss S (1998) Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes. *Mol Microbiol* 28: 1081 - 1089
- Jacobs T, Darji A, Weiss S and Chakraborty T (1999) Listeriolysin, the thiol-activated haemolysin of *Listeria monocytogenes*. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins: 511 - 521
- Joiner WJ, Wang LY, Tang MD and Kaczmarek LK (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11013 - 11018
- Kaulin YA, Schagina LV, Bezrukov SM, Malev VV, Feigin AM, Takemoto JY, Teeter JH and Brand JG (1998) Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. *Biophys J* 74: 2918 - 2925
- Kayal S, Lilienbaum A, Poyart C, Memet S, Israel A and Berche P (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* 31: 1709 - 1722
- Krull M, Nost R, Hippenstiel S, Domann E, Chakraborty T and Suttorp N (1997) *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol* 159: 1970 - 1976
- Kuhn M, Pfeuffer T, Greiffenberg L and Goebel W (1999) Host cell signal transduction during *Listeria monocytogenes* infection. *Arch Biochem Biophys* 372: 166 - 172
- Larsen EH, Gabriei SE, Stutts MJ, Fullton J, Price EM and Boucher RC (1996) Endogenous chloride channels of insect sf9 cells. Evidence for coordinated activity of small elementary channel units. *J Gen Physiol* 107: 695 - 714
- Leimeister-Wächter M and Chakraborty T (1989) Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*. *Infect Immun* 57: 2350 - 2357
- Leimeister-Wächter M, Haffner C, Domann E, Goebel W and Chakraborty T (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8336 - 8340
- Marks PW and Maxfield FR (1991) Preparation of solutions with free calcium concentration in the nanomolar range using 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid. *Anal Biochem* 193: 61 - 71
- Moolenaar WH (1999) Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res* 253: 230 - 238
- Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207: 123 - 131
- Neher E and Sakmann B (1995) Single-channel recording: the whole cell recording configuration from a chemical point of view. 42 ff

- Nishibori T, Xiong H, Kawamura I, Arakawa M and Mitsuyama M (1996) Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infect Immun* 64: 3188 - 3195
- Nofer JR, Tepel M, Walter M, Seedorf U, Assmann G and Zidek W (1997) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates thapsigargin-induced calcium influx in human lymphocytes. *J Biol Chem* 272: 32861 – 32868
- Ordway RW, Petrou S, Kirber MT, Walsh JV Jr and Singer JJ (1995) Stretch activation of a toad smooth muscle K<sup>+</sup> channel may be mediated by fatty acids. *J Physiol* 484: 331 - 337
- Petrou S, Ordway RW, Kirber MT, Dopico AM, Hamilton JA, Walsh JV Jr and Singer JJ (1995) Direct effects of fatty acids and other charged lipids on ion channel activity in smooth muscle cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52: 173 - 178
- Portnoy DA, Jacks PS and Hinrichs DJ (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 167: 1459 - 1471
- Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W and Cossart P (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 60: 1263 - 1267
- Randall AD (1998) The molecular basis of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel diversity: is it time for T? *J Membr Biol* 161: 207 - 213
- Repp H, Koschinski A, Decker K and Dreyer F (1998) Activation of a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current in mouse fibroblasts by lysophosphatidic acid requires a pertussis toxin-sensitive G protein and Ras. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358: 509 - 517
- Repp H, Pamukci Z, Koschinski A, Domann E, Darji A, Birringer J, Brockmeier D, Chakraborty T, Dreyer F (2002) Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca<sup>2+</sup>-permeable pores leading to intracellular Ca<sup>2+</sup>-oscillations. *Cellular Microbiology* 4(8): 483 - 491
- Rink TJ (1990) Receptor-mediated calcium entry. *FEBS Lett* 268: 381-385
- Rossjohn J, Feil SC, McKinstry WJ, Tweten RK and Parker MW (1997) Structure of a cholesterol-binding thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89: 685 - 692
- Schuchat A, Swaminathan B and Broome CV (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 4: 169 - 183
- Sekino-Suzuki N, Nakamura M, Mitsui KI and Ohno Iwashita Y (1996) Contribution of individual tryptophane residues to the structure and activity of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolysin. *Eur J Biochem* 241: 941 - 947
- Sellman BR, Mourez M and Collier RJ (2001) Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science* 292: 695 - 697
- Sibeliuss U, Rose F, Chakraborty T, Darji A, Wehland J, Weiss S, Seeger W and Grimminger F (1996) Listeriolysin is a potent inducer of the phosphatidylinositol response and lipid mediator generation in human endothelial cells. *Infect Immun* 64: 674 - 676

- Striessnig J, Grabner M, Mitterdorfer J, Hering S, Sinnegger MJ and Glossmann H (1998) Structural basis of drug binding to L  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Trends Pharmacol Sci 19: 108 - 115
- Tang P, Rosenshine I, Cossart P and Finlay BB (1996) Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. Infect Immun 64: 2359 - 2361
- Tilney LG and Tilney MS (1993) The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. Trends Microbiol 1: 25 - 31
- Tweten RK, Parker MW and Johnson AE (2001) The cholesterol-dependent cytolysins. Curr Top Microbiol Immunol 257: 15 - 33
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J and Kreft J (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 14: 584 - 640
- Wadsworth SJ and Goldfine H (1999) *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. Infect Immun 67: 1770 - 1778



Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, Dezember 2004

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Renate Susanne Butler, geb. Sack  
geboren am 10. September 1969 in Wolverhampton/GB  
deutsche und britische Staatsangehörigkeit

### **Hochschulausbildung**

10/1997 - 11/2004	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
11/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote „gut“ Approbation als Ärztin

### **Dissertation**

seit 10/2000	Doktorandin am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, AG Prof. Dr. Florian Dreyer
--------------	--

### **Schulausbildung**

07/1988	Fachhochschulreife an der Liebigschule Giessen
06/1997	Abitur am Abendgymnasium Giessen, Note 1,3

### **Berufsausbildung, berufliche und studienbegleitende Tätigkeiten**

08/1988 - 06/1990	Ausbildung zur „Staatlich geprüften Fremdsprachensekretärin“ an der Friedrich-Feld-Schule Giessen
08/1990 - 09/1997	Berufstätigkeit als Fremdsprachensekretärin, Sekretärin der Vertriebsleitung und Sekretärin der Geschäftsleitung Behringwerke AG, Marburg KesslerTech GmbH, Giessen dmt GmbH, Buseck
10/1997 - 07/1999	Sekretärin der Geschäftsleitung - ¼ Stelle dmt GmbH, Buseck
10/1999 - 05/2000	Stationsdienste und Nachtwachen am Universitätsklinikum Giessen
06/2000 - 06/2004	Angestellte in der Datenverarbeitung - ¼ Stelle Abteilung Anästhesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie, Universitätsklinikum Giessen

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer, für die Überlassung des Promotionsthemas und seine motivierende und hilfreiche Unterstützung, sowohl in der experimentellen Phase als auch ganz besonders bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Einen besseren Doktorvater kann man sich nicht wünschen.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Koschinski für seine Geduld, seine große Hilfsbereitschaft und dass er immer ein offenes Ohr für plötzlich auftretende (PC-)Probleme und sonstige Schwierigkeiten hatte. Herrn Dr. Holger Repp danke ich für seine Hilfs- und Erklärungsbereitschaft und seine Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit. Meinem ehemaligen Mitdoktoranden Jan Birringer möchte ich für seine Hilfe in meiner Anfangszeit als „Patcherin“ und für viele lustige Stunden im Labor danken.

Frau Christiane Zibuschka danke ich für ihre Hilfe in der Zellkultur und ganz besonders für ihren großartigen Einsatz bei der Aufbereitung unserer „Lissis“.

Für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Porenströme und die Erstellung der Amplitudenhistogramme danke ich Herrn Prof. Dr. Dierk Brockmeier ganz herzlich.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglicht haben und damit auch die Anfertigung dieser Arbeit.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit PD Dr. Eugen Domann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Chakraborty vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen durchgeführt. Vielen Dank für die Bereitstellung der Listerienstämme.